Morphologische und enzymelektrophoretische Untersuchungen zur Taxonomie und Verwandtschaft hypotricher Ciliaten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Klaus Martin Schlegel
aus Reutlingen

1983

UNIV.
LUTHER
SEM.

Morphologische und enzymelektrophoretische Untersuchungen zur Taxonomie und Verwandtschaft hypotricher Ciliaten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Klaus Martin Schlegel
aus Reutlingen

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	27. September 1983
Dekan:	Prof. Dr. K. P. Hadeler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Ammermann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Sperlich

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Ammermann für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bedanken.

Für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen danke ich außerdem Dr. G. Steinbrück, Dr. H. J. Lipps und Dr. H. Schmalfuss.

Dank schulde ich ebenfalls Herrn Dr. W. Pinsker und den Mitarbeitern des Lehrstuhls Populationsgenetik für die ständige Hilfsbereitschaft und vielseitige Beratung bei der Enzymelektrophorese.

Für die hervorragende Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Frau I. Dahlström und allen Mitarbeitern der Abteilung Zellbiologie.

Viele Anregungen erhielt ich von Herrn Dr. A. Tait, in dessen Labor ich während eines zweiwöchigen Aufenthaltes wertvolle Erfahrungen sammeln konnte. Für seine Bemühungen und sein Interesse danke ich Herrn Dr. Tait. Der Aufenthalt am Institute of Animal Genetics, Universität Edinburgh, wurde durch ein großzügiges Stipendium der Reinhold - und - Maria - Teufel - Stiftung ermöglicht.

für Renate

Inhalt

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Herkunft des Untersuchungsmaterials	4
2.2.	Kulturbedingungen	7
2.3.	Morphologische Untersuchungen	7
2.3.1.	Lichtmikroskopie	7
2.3.2.	Rasterelektronenmikroskopie	9
2.4.	Enzymelektrophoretische Untersuchungen	10
2.4.1.	Aufbereitung der Kulturen	10
2.4.2.	Stärkegelelektrophorese	11
2.4.3.	Polyacrylamidgelelektrophorese	11
2.4.4.	Liste der untersuchten Enzyme	12
3.	Ergebnisse	20
3.1.	Morphologische Untersuchungen	20
3.1.1.	Oxytrichidae	20
3.1.2.	Urostylidae	31
3.2.	Enzymelektrophorese	33
3.2.1.	Amylase	33
3.2.2.	Isocitronensäuredehydrogenase	34
3.2.3.	Allozympolymorphismus bei S. mytilus u. S. lemnae	44
3.2.4.	Genetische Identität	45
3.2.4.1.	Genetische Identität zwischen Arten der Gattung Stylonychia und Oxytricha fallax	54
3.2.4.2.	Geographische Differenzierung bei Stylonychia mytilus	61

UNIV. LEIDEN BIBL.

3.2.4.3.	Genetische Identität zwischen Arten der Gattung Euplotes	61
3.2.4.4.	Genetische Identität von zwei unbestimmten Klonen zueinander und zu Vertretern der Urostylidae und Oxytrichidae	63
4.	Diskussion	66
4.1.	Vergleich der Geschwisterarten Stylonychia mytilus und S. lemnae	66
4.1.1.	Intraspezifischer Enzympolymorphismus	68
4.1.2.	Geographische Differenzierung	69
4.2.	Genetische Identität zwischen Arten der Gattung Stylonychia und O. fallax, Vergleich mit den morphologischen Ergebnissen	70
4.3.	Genetische Identität in der Gattung Euplotes	72
4.4.	Probleme und Grenzen der Methode	73
4.5.	Phylogenetische Aspekte	74
5.	Anhang: Biochemischer Bestimmungsschlüssel für die Stylonychia - Gruppe	78
6.	Zusammenfassung	80
7.	Literatur	83

Einleitung

Die Ordnung Hypotricha ist eine morphologisch deutlich abgegrenzte Gruppe innerhalb der Ciliaten und seit langem bekannt (Müller, 1773; Ehrenberg, 1838 Stein, 1859; Bütschli, 1889).

Die phylogenetischen Beziehungen der höheren Taxa wurden im Prinzip schon von Stein in seiner grundlegenden Arbeit von 1859 dargestellt. Seine Vorstellungen werden, mit Veränderungen, heute noch akzeptiert (Corliss, 1979; Sleigh, 1975). Dagegen gibt es bis heute wenige Vorstellungen über genealogische Zusammenhänge in den niederen Taxa. Die meisten Autoren (Borror, 1972; Stiller, 1974; Dragesco, 1966; u. a.) beschäftigen sich mit taxonomischen Problemen, die, aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten vieler Arten, oft schwer zu lösen sind. Seit Beginn der sechziger Jahre wird allgemein der Vergleich von Morphogenese-Mustern während der Zellteilung für die Klassifikation der niederen Taxa herangezogen. (Borror, 1972; Borror, 1979; Hemberger, 1982).

Mit der Entdeckung der Paarungstypen bei Paramecium aurelia durch Sonneborn (1937) wurde die Situation in der Systematik der Ciliaten noch erheblich kompliziert. Er erkannte, daß diese "Art" aus mehreren genetisch gegeneinander isolierten Gruppen von Paarungstypen besteht, die sich morphologisch nicht oder nur sehr wenig unterscheiden. Diese wurden zunächst als Varietäten einer Art und später als Syngens (Sonneborn, 1957) bezeichnet, obwohl es sich um biologische Arten handelte. Von einer Artbeschreibung wurde zu diesem Zeitpunkt abgesehen, da es an praktischen Möglichkeiten fehlte, diese zu unterscheiden und zu bestimmen (mit Ausnahme der zeitaufwendigen Kreuzungsexperimente, die lebende Referenzstämme erfordern und die Gefahr der Verwechslung in sich bergen). Syngens wurden auch in anderen Gruppen gefunden, z. B. bei Tetrahymena pyriformis (Elliot, 1953), Stylonychia mytilus (Ammermann, 1965), Euplotes patella (Kimball, 1942), Euplotes vannus (Heckmann, 1963), Euplotes crassus (Heckmann, 1964).

Zur Klärung systematischer Fragen wurden mit Erfolg auch biochemische Methoden eingesetzt. Eine dieser Methoden ist die von Hunter und Markert (1957) entwickelte elektrophoretische Auftrennung von nativen Enzym-

proteinen.

Dabei werden die löslichen Proteine einer Probe in einem gepufferten Trägersystem (z. B. Stärkegel) nach der elektrischen Ladung aufgetrennt. Anschließend kann die Position eines bestimmten Enzymproteins im Trennmedium durch Koppelung der substratspezifischen Enzymreaktion mit einer geeigneten Färbereaktion nachgewiesen werden (ausführliche Darstellung der verschiedenen Methoden u. a. bei Andrews, 1981; Harris und Hopkinson, 1976). Sind die Enzyme verschiedener Proben unterschiedlich weit gewandert (aufgrund unterschiedlicher Gesamtladungen), zeigen sie bei der Färbung unterschiedliche Positionen im Gel. Vergleicht man auf diese Weise die Wanderungsgeschwindigkeit von Enzymen verschiedener Taxa (z. B. verschiedene Arten), können diese anhand der Positionen der Enzymbanden im Gel erkannt und unterschieden werden.

Mit dieser Methode konnten auch die verschiedenen Syngens einer "Art" verglichen und unterschieden werden (Tait, 1970; Tait, 1978; Borden et. al., 1973; Borden et. al., 1977). Die Syngens der bekanntesten Artenkomplexe, P. aurelia und T. pyriformis, wurden daraufhin als Arten neu beschrieben (Sonneborn, 1975; Nanney und McCoy, 1976).

Unterschiedliche Bandenpositionen ($\hat{=}$ unterschiedliche Gesamtladungen der Enzymproteine) zeigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der verglichenen Proteine und somit Unterschiede in den betreffenden Strukturgenen an.

Geht man davon aus, daß Punktmutationen über lange Zeiträume hinweg gesehen relativ regelmäßig eintretende Ereignisse sind, kann, über die Taxonomie hinaus, mit Hilfe des Vergleichs von möglichst vielen Enzymproteinen die Verwandtschaft z. B. zwischen zwei Arten geschätzt werden. Die gebräuchlichste Methode wurde von Nei (1972) entwickelt. Mit Hilfe der Allelfrequenzen, die zwei Taxa für einen homologen Locus aufweisen, werden die genetische Identität (I) und die genetische Distanz ($D = - \ln I$) für diesen Locus berechnet. Der Grad der Verwandtschaft zwischen zwei untersuchten Gruppen (Populationen, Arten, ...) wird dabei durch die mittlere genetische Identität ($\bar{I}$), bzw. durch die mittlere genetische Distanz ($\bar{D}$) ausgedrückt, die sich aus den arith-

metischen Mitteln der Identitäts- und Distanzwerte aller untersuchten Loci ergeben.

Werden mehrere Gruppen paarweise miteinander verglichen, kann mit den Identitäts- bzw. Distanzwerten ein Dendrogramm konstruiert werden, wobei verschiedene Methoden Verwendung finden, z. B. die "unweighted pair group analysis by means of arithmetic" (UPGMA, Sneath und Sokal, 1973) oder die "phylogenetic tree" - Methode (Fitch und Margoliash, 1967). Hierbei handelt es sich um phenetische Dendrogramme bei denen der Grad der Verwandschaft verglichener Taxa mit dem Maß an Ähnlichkeit (hier: genetischer Ähnlichkeit) gleichgesetzt wird.

Es wird ebenfalls versucht, Enzymdaten mit Hilfe der Hennig'schen Methode (Hennig, 1982) cladistisch auszuwerten (Avise et. al., 1980; Patton et. al., 1981). Bei dieser Methode wird beim Vergleich homologer Merkmale (hier: homologer Enzymproteine) zwischen ursprünglichen und abgeleiteten Merkmalen unterschieden. Abgeleitete Merkmale, die eine Gruppe gegenüber einer anderen auszeichnen (Hennig: Synapomorphien) werden als qualitative Merkmale für jede Aufzweigung eines phylogenetischen Cladogramms herangezogen (zur näheren Erläuterung dieser Argumentation s. auch Schlee, 1971).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe morphologischer und biochemischer Kriterien die beiden Geschwisterarten Stylonychia mytilus und Stylonychia lemnae untereinander und mit anderen Arten der Gattung Stylonychia (Familie Oxytrichidae) zu vergleichen. Darüberhinaus sollte durch die Analyse von Vertretern anderer Gattungen und anderer Familien ermittelt werden, bis zu welchem taxonomischen Rang bei Ciliaten ein Vergleich von Enzymdaten noch sinnvoll ist. Dazu wurden Vertreter der Urostylidae und Euplotidae herangezogen. Über die taxonomische Zuordnung hinaus sollte versucht werden, mit Hilfe von Enzymdaten unter Verwendung einer phenetischen und, wenn möglich, einer cladistischen Methode die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Arten zu klären.

2. Material und Methoden

2.1. Herkunft des Untersuchungsmaterials

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ciliaten sowie deren Herkunft sind in Tabelle 1 aufgeführt. Teilweise wurden Tiere aus selbst gesammelten Rohkulturen isoliert: Tümpelwasser wurde über eine Nylongaze mit 30 µm Maschenweite gefiltert und der Rückstand in eine Plastikflasche gespült. Im Labor wurden die Rohkulturen in Petrischalen umgesetzt, mit wenig Algensuspension (Chlorogonium elongatum) angefüttert und daraus einzelne Zellen isoliert. Mit dieser Methode können jedoch nur größere Ciliaten gewonnen werden, kleine Zellen fallen durch die Gaze durch. Deshalb wurde auch ungefiltertes Wasser verwendet.

Andere Kulturen wurden mir von verschiedenen Labors zur Verfügung gestellt:

Prof. Ammermann (verschiedene Stämme von S. mytilus und S. lemnae, Euplotes aediculatus); J. Diekmann und Dr. H.-D. Görtz, Münster (S. mytilus, S. lemnae); Prof. Heckmann, Münster (Euplotes eurystomus, E. plumipes, E. woodruffi, versch. Stämme von Paraurostyla weissei); Dr. Y. Oka, Osaka, Japan (Stylonychia pustulata); Prof. Prescott, Boulder, Colorado, USA (Styx I, Styx II); Protozoologisches Labor des Instituts für Biologie III der Universität Tübingen (Oxytricha fallax); Prof. Shi Xinbai, Harbin, Volksrepublik China (S. mytilus); Dr. G. R. Sapra, Dehli, Indien (S. mytilus); Dr. E. Small, College Park, Maryland, USA (S. lemnae); Dr. J. Sommerville, St. Andrews, Schottland (Rohkultur).

(An dieser Stelle möchte ich mich für die Überlassung der Kulturen herzlich bedanken.)

Tabelle 1 Liste der untersuchten Ciliaten

Art	Herkunft
Stylonychia mytilus	verschiedene Tümpel bei Tübingen
Ehrenberg, 1838	See in einem aufgelassenen Tuffstein-bruch bei Reutlingen-Gönningen
	Federsee
	verschiedene Seen in Oberschwaben
	Münster
	verschiedene Tümpel bei Cuxhaven
	Harbin, Volksrepublik China (Mongolei)
	Kaschmir, Indien
Stylonychia lemnae	verschiedene Tümpel bei Tübingen
Ammermann und Schlegel, 1983	See in einem aufgelassenen Tuffstein-bruch bei Reutlingen-Gönningen
	Rohrsee, Oberschwaben
	Schweigfahrtsee, Oberschwaben
	Taubergießen, Altarm des Rheins
	Münster
	verschiedene Tümpel bei Cuxhaven
	Bornholm, Dänemark
	Greenbelt - Lake, College Park, Maryland, USA

Tabelle 1 (Forts.)

Art	Herkunft
Stylonychia pustulata Ehrenberg, 1838	Dr. Y. Oka, Osaka, Japan
Stylonychia spec.	verschiedene Tümpel bei Tübingen verschiedene Tümpel bei Cuxhaven Boulder, Colorado, USA
Stylonychia pusilla Kahl, 1932	St. Andrews, Schottland
Oxytricha fallax Stein, 1859	Institut für Biologie III, Tübingen
Styx I, Styx II	Prof. Prescott, Boulder, Colorado, USA
Paraurostyla weissei (Stein, 1859) Borror, 1972	Prof. Heckmann, Münster
Euplotes aediculatus Pierson, 1943	Etang de Berre, Marseille, Frankreich
Euplotes eurystomus Wrzesniowski, 1869	Prof. Heckmann, Münster
Euplotes plumipes Stokes, 1884	" " "
Euplotes woodruffi Gaw, 1939	" " "
Euplotes crassus (Dujardin, 1841) Kahl, 1932	Prof. Luporini, Camerino, Italien

2.2 Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden in Boveri- oder Petrischalen in Pringsheim-Lösung (modifiziert nach Chapman - Andresen, 1958) gehalten:

0,85 mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 2\ H_2O$
0,35 mM KCL
0,11 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$

pH 6,8 - 7,0

Täglich wurden die Tiere mit einer Suspension des Flagellaten Chlorogonium elongatum gefüttert (Ammermann, 1974). Einmal wöchentlich wurden einige der Tiere in neue Schalen umgesetzt und der Rest verworfen. Zeitweise war das Wachstum der Kulturen schlecht. Zum Teil war dies bedingt durch bakterielle Infektionen, die mit 0.5 mg/ml Pennicillin (Grünenthal) oder in besonders hartnäckigen Fällen mit 0.1 - 0.5 mg Streptomycin (Serva) behandelt wurden. Diese Therapie läßt sich jedoch bei Süßwasser-Euplotes-Arten nicht durchführen, da offensichtlich lebensnotwendige Endosymbionten durch die Antibiotika geschädigt werden. Weitere Probleme waren Kontaminationen mit anderen Ciliaten (z. B. Colpoda) und/oder mit Heliozoen. Manchmal blieb nur das Anlegen von Subklonen der einzige Ausweg.

Abweichend von den genannten Kulturbedingungen wurde die marine Art Euplotes crassus in Seewasser gehalten und täglich mit dem Flagellaten Dunaliella salina gefüttert.

2.3. Morphologische Untersuchungen

2.3.1. Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden an lebenden Ciliaten durchgeführt, um möglichst exakte Informationen über Länge und Form der Zellen zu erhalten, da diese bei fixiertem und gefärbtem Material verändert sein können. Fotografiert wurde zuerst ein Objektmikrometer (Olympus). Bei derselben Vergrößerung, im Phasenkontrast, wurden dann die Tiere mit Blitzlicht fotografiert Bei der Herstellung der Papierabzüge wurde ebenfalls derselbe Abbildungsmaßstab eingehalten, so daß das Foto des Objektmikrometers als Längenmaßstab zu verwenden war.

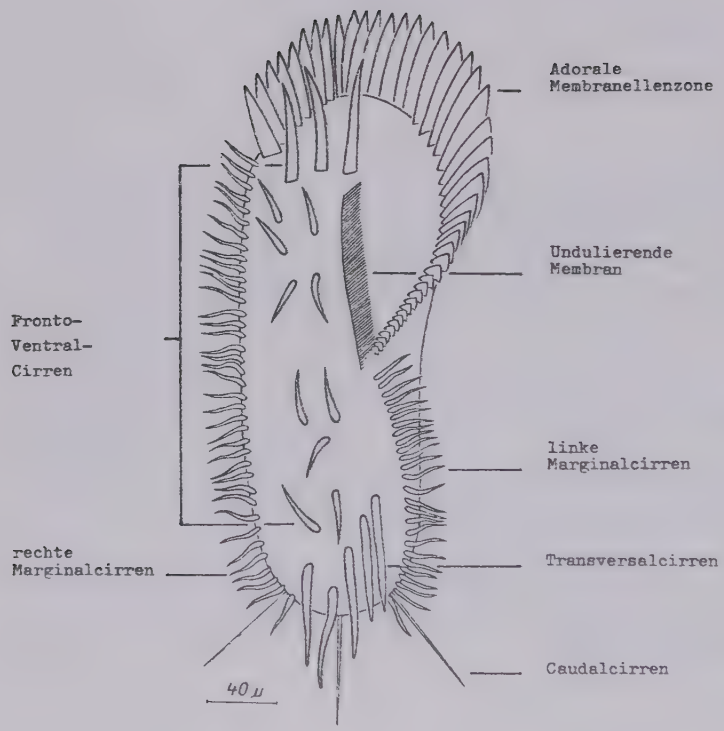


Abb. 1 Stylonychia mytilus, ventral

2.3.2. Rasterelektronenmikroskopie

Zur Darstellung der taxonomisch wichtigen Cilienstrukturen (Abb. 1) wurden von allen untersuchten Arten, mit Ausnahme der Euplotes - Arten u. P. weissei, Präparate für das Rasterelektronenmikroskop angefertigt:

Zuerst wurden die Tiere durch vorsichtiges Abzentrifugieren (max. 100 x g) konzentriert, der Überstand (Kulturmedium) dekantiert, und anschließend mit einem Fixiergemisch nach Shigenaka (Shigenaka et. al., 1973) 30 Minuten fixiert:

3.6 ml 150 mM KH_2PO_4/Na_2HPO_4 . pH 7.0
(4 ml KH_2PO_4 + 6 ml Na_2HPO_4 ergeben einen pH von 7)

0.1 ml 1 mM $MgSO_4$. 7 H_2O

0.1 ml 100 mM Saccharose

1.2 ml Glutaraldehyd 25 % (Serva)

2.5 ml H_2O (bidestilliert)

2.5 ml OsO_4 4 % (Merck, in bidestilliertem H_2O)

Glutaraldehyd und OsO_4 wurden erst kurz vor der Fixierung zugegeben.

Nach der Fixierung wurde wieder leicht abzentrifugiert, das Fixans abgekippt und die Zellen zweimal in Puffer gewaschen. Anschließend wurde auf die gleiche Weise in einer Alkoholreihe (je 10 Min.) bis zur 70 % - Stufe entwässert und die Tiere bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

Vor der weiteren Entwässerung wurden die Präparate auf runde Deckgläschen (Ø 12 mm) montiert, die zuvor mit Poly-L-Lysin (0.05 mg/ml, Serva) beschichtet und getrocknet worden waren, was eine gute Haftung der Ciliaten auf den Deckgläschen ergab. Die Zellen wurden direkt auf die in 70 % Äthanol liegenden Deckgläschen pipettiert und nach 10 Min. in die nächst höhere Alkoholstufe (80 %) gebracht. Die endgültige Entwässerung erfolgte über 90 % und 2 x 100 % Äthanol.

Getrocknet wurden die Präparate in einem "Critical-Point"-Trocknungs-

apparat der Fa. Polaron in flüssigem CO_2 ohne ein Intermedium (z. B. Isoamylacetat) zu verwenden. Anschließend wurden die Präparate mit einem Gold-Palladium-Target im Hochvakuum besputtert, in einem Cambridge Stereoscan 250 Mk 2 untersucht und mit Ilford FP4, 22 Din, fotografiert (Hayat, 1981; Reimer und Pfefferkorn, 1977; Rosenbauer und Kegel, 1978).

2.4. Enzymelektrophoretische Untersuchungen

2.4.1. Aufbereitung der Kulturen

Für die Elektrophorese wurden Kulturen in Petrischalen (Ø 15 cm) angezogen. Diese erreichten dabei eine Dichte von 2×10^5 - 10^6 Zellen in ca. 100 ml Medium. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Chlorogonium-Zellen zu vermeiden, wurden die Tiere einen Tag vor der Aufbereitung nicht mehr gefüttert. Zellen aus einer Kulturschale (bei kleinen Ciliaten, z. B. S. pusilla, aus zwei Kulturschalen) wurden über eine Nylongaze mit 90 µm Maschenweite gefiltert, um grobe Schmutzpartikel zu entfernen. Anschließend wurden die Proben durch langsame Zentrifugation konzentriert. Für größere Ciliaten (z. B. s. mytilus) war eine Zentrifugation von 5 Min. bei ca. 500 rpm (ca.50 x g) ausreichend, um die Zellen zu pelletieren. Kleinere Arten wurden bei max. 200 x g konzentriert.

Überstehendes Kulturmedium wurde anschließend mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Pellet der noch nicht lysierten Zellen mit dem gleichen Volumen Homogenisationspuffer versetzt:

10 mM Tris - HCl, pH 7.4 (Merck)
1 mM EDTA (Merck)
2 % Triton - X - 100 (Sigma)
1 mM Dithiothreit (Serva)

Dadurch wurde eine annähernd gleiche Konzentration der Proben erreicht.

Nach einer Lysierzeit von 30 Min., während der die Proben gelegentlich geschüttelt wurden, wurde 10 Min. bei 10 000 x g zentrifugiert und der Überstand für die Elektrophorese verwendet. Alle Vorgänge wurden bei 4° C durchgeführt. Der Proteingehalt der Überstände wurde nach der Methode von Lowry (Lowry et. al., 1951) bestimmt. Dabei ergab sich ein Gesamtproteingehalt entsprechend 10 µg/µl Rinderserumalbumin.

Nicht sofort verwendete Proben wurden in Portionen zu 40 µl bei - 70° C eingefroren und konnten ohne wesentlichen Verlust an Enzymaktivität noch nach Wochen verwendet werden. Jedoch ergaben sich bei länger aufbewahrten Proben teilweise unscharfe Banden, gelegentlich traten sogar zusätzliche Banden auf, die wohl als Abbauprodukte gedeutet werden müssen. Es empfahl sich deshalb, die Proben so schnell wie möglich nach der Aufbereitung zu verwenden.

2.4.2. Stärkegel - Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden Horizontalgele (10 %) in 190 x 150 x 5 mm Plexiglaswannen gegossen, wobei die Stärke von zwei verschiedenen Herstellern gemischt wurde (4.75 % Electrostarch, 5.25 % Sigma). Die Proben wurden zuerst auf 5 x 10 mm große Streifen aus Filterpapier oder Cellulose - Acetat (Schleicher und Schüll) pipettiert und diese in vorgestanzte Schlitze entlang einer Startlinie in die Gele geschoben. Cellulose - Acetat - Streifen ergeben dabei eine durchweg höhere Bandenschärfe, können jedoch nicht soviel Flüssigkeit aufsaugen wie Filterpapier. So war es zur Darstellung mancher Enzyme notwendig, Filterpapierstreifen zu verwenden. (s. Tab. 2).

Alle Versuche wurden im Kühlraum bei 4° C durchgeführt. Zusätzliche Kühlung erfolgte durch Eisbeutel, die auf die Gele gelegt wurden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über drei Stunden bei 200 V konstant und ca. 80 mA, bzw. 4 Stunden bei 100 V konstant und ca. 80 mA für Gele, auf denen peptidspaltende Enzyme dargestellt werden sollten. Anschließend wurden die Gele in drei Scheiben geschnitten. Die Deckscheibe wurde verworfen, die beiden anderen Scheiben zur Färbung verwendet, wobei die in der Literatur beschriebenen Methoden, z. T. leicht modifiziert, verwendet wurden (Andrews, 1981; Harris und Hopkinson, 1976; Brewer, 1970; Shaw und Prasad, 1970; Shaw und Koehn, 1968). Die Zusammensetzung der Färbelösungen, Pufferbedingungen für die Elektrophorese und Darstellung der Enzymproteine sind in Tabelle 2 aufgeführt.

2.4.3. Polyacrylamidgel - Elektrophorese

Für die Proteinauftrennung zur anschließenden Darstellung der Amylase -

Aktivität wurden Polyacrylamidgele nach der Methode von Davis (1964), jedoch ohne Zusatz von denaturierendem Na - Dodecylsulfat, verwendet. Der Nachweis der Amylase - Aktivität erfolgte nach Hickey (1979), leicht modifiziert:

Die Konzentration des Trenngels betrug 7.5 % Acrylamid/0.2 % Bis - Acrylamid, die des Sammelgels 4 % Acrylamid/0.1 % Bis - Acrylamid. 30 µl einer Probe wurden mit 10 µl Glycerin und 2 µl Bromphenolblau gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde über 18 Stunden bei konstant 100 V im Kühlraum durchgeführt, wobei der Stromfluß von anfangs 30 mA auf ca. 5 mA absank. Als Elektrophorese - Puffer wurde verwendet:

Kathode: 0.38 M Glycin (Merck), mit 1 M Tris auf pH 8.3 eingestellt
Anode: 0.12 M Tris, mit 1 N HCl auf pH 8.1 eingestellt.

Darstellung der Enzymaktivität

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele in einer Stärkelösung 90 Min. inkubiert:

1 g lösliche Stärke (Sigma) und 220 mg $CaOl_2$ wurden in 100 ml Tris - HCl, pH 7.5 gelöst, aufgekocht und abfiltriert. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur, um ein möglichst gleichmäßiges Eindringen der Stärke in das Gel zu erreichen, wurde gleichzeitig geschüttelt.

Anschließend, nach zweimaligem abwaschen der Gele mit Aqua bidest. wurde mit einer Färbelösung (3 mg/ml KJ , 1,3 mg/ml Jod) die ins Gel eingedrungene Stärke gefärbt. In Zonen der Enzymaktivität wurde die Stärke abgebaut, sie erscheinen daher als weiße Banden auf den blau gefärbten Gelen.

2.4.4. Liste der untersuchten Enzyme

Im Folgenden sind die untersuchten Enzyme aufgelistet. In Klammer sind die Abkürzungen und die Zahl der verschiedenen Loci angegeben, die insgesamt beobachtet wurden.

EC - Nummer[1)]	Name
1.1.1.37	Malatdehydrogenase (Mdh, 3)
1.1.1.40	Malatdehydrogenase, NADP, decarboxylierend = "Malic Enzyme" (Me, 3)
1.1.1.42	Isocitratdehydrogenase, NADP (Idh, 4)
1.4.1.42	Glutamatdehydrogenase (Gdh, 1)
1.6.2.2.	Cytochrom b_5 Reductase = "Diaphorase" (Dia, 2)
1.15.1.1.	Superoxid Dismutase (Sdm, 1)
2.6.1.2	Alanin Aminotransferase (Alat, 2)
2.7.5.1	Phosphoglucomutase (Pgm, 3)
3.1.1.1	Carboxyl Esterase (Est, 2)
3.1.3.2	Saure Phosphatase (AcP, 1)
3.2.1.1	α - Amylase (Amy, 2)
3.4.	Peptidase I (Pept, 2)
3.4.	Peptidase II (1)
3.4.	Peptidase III (1)
3.4.	Peptidase IV (2)
4.1.2.13	Fructosebisphosphat Aldolase (Ald, 1)
5.3.1.9	Glucosephosphat Isomerase (Gpi, 1)
	Threonindehydrogenase (Tdh, 1)

1) Enzyme Nomenclature 1973

Tabelle 2 Färbelösungen und Elektrophoresepuffer

Enzym	Substrat	Chemikalien für Enzymreaktion + Färbereaktion	Puffer	Elektrophoresepuffer Gel	Elektrode	Probenauftrag[1]
Est.	4-Methylumbelliferyl-Propionat 2 mg		0.16 M Na_2HPO_4 0.069 M KH_2PO_4 pH 6.5, 10 ml[2]	0.077 M Tris 0.006 M Citronensäure, pH 8.6	0.29 M H_3BO_3 0.06 M NaOH pH 8.1	1
Gdh	Na-Glutamat 300 mg	NAD 10 mg MTT 10 mg PMS 1 mg 2 % Agar, 25 ml[3]	0.02 M NaH_2PO_4 0.08 M Na_2HPO_4 pH 7.4, 25 ml	"	"	1
Idh	Na_3-Isocitronensäure 20 mg	NADP 10 mg MTT 10 mg $MgCl_2$ 200 mg	0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 25 ml	0.019 M Tris 0.005 M Citronensäure, pH 8.6	0.094 M Tris 0.0235 M Citronensäure, pH 8.6	2
Alat	DL-Alanin 188 mg -Ketoglutarat 50 mg	NADH 5 mg Ldh 40 µl (2750 u/ml)	0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 ml[2]	"	"	2
Mdh	L-Äpfelsäure 150 mg	NAD 10 mg MTT 10 mg EDTA 10 mg PMS 1 mg 2 % Agar, 25 ml	0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 25 ml	"	"	2

Tabelle 2, Fortsetzung

Enzym	Substrat	Chemikalien für Enzymreaktion + Färbereaktion	Puffer	Elektrophoresepuffer Gel	Elektrode	Probenauftrag[1)]
Me	L-Äpfelsäure	NADP 10 mg MTT 10 mg $MgCl_2$ 50 mg EDTA 10 mg PMS 1 mg 2 % Agar, 25 ml	0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 25 ml	0.019 M Tris 0.005 M Citronensäure, pH 8.6	0.094 M Tris 0.0235 M Citronensäure, pH 8.6	2
Sdm	-	NBT 10 mg PMS 2 mg	0.06 M Tris-HCl, pH 9.5, 50 ml	"	"	2
Tdh	L-Threonin 300 mg	NAD 10 mg MTT 10 mg KCl 225 mg PMS 1 mg 2 % Agar, 25 ml	0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 25 ml	"	"	2
Ald	Fructose-1,6-diphosphat 100 mg	NAD 30 mg MTT 15 mg Na_2HASO_4 Glycerinaldehyd-3-Pdh 50 µl PMS 1 mg 2 % Agar, 25 ml	0.1 M Tris-HCl, pH 7.1, 25 ml	0.014 M Tris 0.004 M Citronensäure, pH 7.0	0.14 M Tris 0.043 M Citronensäure, pH 7.0	1

Tabelle 2, Fortsetzung

Enzym	Substrat	Chemikalien für Enzymreaktion + Färbereaktion	Puffer	Elektrophoresepuffer Gel	Elektrode	Probenauftrag
Dia	Dichlorphenol-Indophenol 5 mg	NADH 10 mg MTT 10 mg	0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 50 ml	0.014 M Tris 0.004 M Citronensäure, pH 7.0	0.14 Tris 0.043 M Citronensäure, pH 7.0	1
Pgi	Fructose-6-Phosphat, 20 mg	NADP 10 mg MTT 10 mg PMS 1 mg 2 % Agar, 25 ml	0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 25 ml	"	"	1
Acph	4-Methylumbelliferyl-Phosphat, 2 mg	-	0.1 M Acetat, pH 5.5, 10 ml	0.01 M Tris 0.0025 M Citronensäure, pH 7.8	0.1 M Tris 0.025 M Citronensäure pH 7.8	1
Pgm	Glucose-1-Phosphat, 200 mg	NADP 10 mg MTT 10 mg $MgCl_2$ 125 mg EDTA 10 mg Glucose-6-Pdh 10 µl PMS 1 mg 2 % Agar, 25 ml	0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 25 ml	"	"	1

Tabelle 2, Fortsetzung

Enzym	Substrat	Chemikalien für Enzymreaktion + Färbereaktion	Puffer	Elektrophoresepuffer Gel	Elektrode	Probenauftrag
Pept.	s. Tab. 2	Aminosäure-oxidase 4 mg o-Dianisidin 4 mg Peroxidase 3 mg 1 M $MnCl_2$ 35 µl 2 % Agar, 25 ml	0.1 M Na_2HPO_4-HCl, pH 7.4, 25 ml	0.009 M Tris 0.012 M NaH_2PO_4 pH 7.0	0.09 M Tris 0.124 M NaH_2PO_4 pH 7.0	2
Amy	Stärke, löslich, 1 g	$CaCl_2$ 220 mg 300 mg KJ 130 mg J_2 100 ml H_2O	0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 100 ml	0.37 M Tris-HCl, pH 8.8 (Trenngel) 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 (Sammelgel)	0.38 M Glycin, 1 M 1 M Tris ad pH 8.3 (Kathode) 0.12 M Tris-HCl, pH 8.1 (Anode)	

1) 1 = Filterpapier (Whatman No. 3)
2 = Celluloseacetat (Schleicher u. Schüll)

2) Inkubation erfolgt mit einem Filterpapier auf das die Färbelösung gegeben wird und das dann auf das Gel gelegt wird

3) 2 % Agar (Serva, reinst) werden aufgekocht, bis 50° C abgekühlt, mit der Färbelösung gemischt und auf das Gel gegossen

Abkürzungen: EDTA = Äthylendinitrilotetraessigsäure -Na_2-Salz (Merck); Ldh = Lactatdehydrogenase (Sigma, 130 units/mg);

MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Sigma);
NBT = 3,3-(3,3-Dimethoxy-4,4-biphenylylen)-bis(2-)p-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium-chlorid(Sigma);
PMS = Phenazin Methosulfat(Serva);
NAD = Nicotinamidadenindinucleotid, (Serva);
NADP = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, (Boehringer);
Glucose-6-Pdh = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Sigma, 300 units/mg);
Glycerinaldehyd-3-Pdh = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Boehringer, 80 units/mg);
Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck)

Die beobachteten Enzymbanden wurden folgendermaßen gekennzeichnet: Ihre Mobilität (Wanderungsstrecke) wurde in Relation zur schnellsten Bande (= 100) von S. mytilus berechnet, die als Referenzprobe auf allen Gelen mitgetestet wurde. Die daraus errechnete Zahl wurde als Index an die jeweilige Abkürzung des Enzymnamens angehängt (z. B. Idh_{95}). Peptid-spaltende Enzyme lassen sich durch ihre geringe Substratspezifität schwer gegeneinander abgrenzen. Oft können bei Verwendung verschiedener Substrate die gleichen Bandenmuster, wenn auch z. T. in unterschiedlicher Intensität, auftreten (z. B. Pept. I). Nur durch Kombination vieler verschiedener Substrate (Tab. 3) konnten vier verschiedene Proteasen identifiziert werden. Auffällig ist jedoch, daß Peptidase IV nur durch Verwendung von Phenylalanyl - Prolin oder Leucyl - Prolin dargestellt werden konnte. Diese Dipeptide werden von keinem der anderen untersuchten Enzyme gespalten. Eine Peptidase mit ähnlicher Substratspezifität findet sich auch beim Menschen (Harris und Hopkinson, 1976). Das als Peptidase D bezeichnete Enzym hydrolysiert außer den beiden genannten Dipeptiden zusätzlich noch Alanyl - Prolin.

Tabelle 3 Liste der als Substrat verwendeten Di- bzw. Tri-Peptide (Sigma) und deren Reaktion mit den dargestellten Proteinenzymen

Substrat	Pept. I	II	III	IV
Glycyl - Tyrosin	X	-	-	-
Leucyl - Alanin	X	-	-	-
Leucyl - Leucin	X	-	-	-
Prolyl - Leucin	X	-	-	-
Valyl - Leucin	X	-	-	-
Phenylalanyl - Leucin	X	X	(X)	-
Leucyl - Glycyl - Glycin	(X)	X	X	-
Leucyl - Leucyl - Leucin	(X)	X	X	-
Leucyl - Prolin	-	-	-	X
Phenylalanyl - Prolin	-	-	-	X

X = starke Reaktion

(X) = schwache Reaktion

3. Ergebnisse

3.1. Morphologische Untersuchungen

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die taxonomisch wichtigen Cilienstrukturen (Kahl, 1932; Borror, 1972) und die mittlere Länge der Tiere sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Alle untersuchten Arten gehören mit Sicherheit zu den Hypotricha: Ventrale Cilien sind zu Cirren zusammengelagert, eine ausgeprägte Adorale Membranellenzone ist vorhanden (Borror, 1972).

Die untersuchten Arten lassen sich zwei Familien zuordnen und sollen im Folgenden kurz kommentiert werden.

3.1.1. Oxytrichidae

Alle untersuchten Arten dieser Familie weisen die typische Differenzierung in Fronto-Ventral-Cirren auf.

Oxytricha fallax: Der untersuchte Stamm besitzt drei deutlich abgesetzte Caudalcirren, die Marginalcirrenreihe ist unterbrochen (Abb. 2a). Diese Merkmale sollen jedoch für die Gattung Stylonychia charakteristisch sein (Borror, 1972; Kahl, 1932). Diese Auffassung wird neuerdings von Hemberger (1982) bezweifelt. Nach seiner Auffassung haben alle Arten der Familie Oxytrichidae keine durchgehende Marginalcirrenreihe. Die Zellform des untersuchten Stammes, die mit der von Kahl (1932, S. 594) gezeichneten übereinstimmt (Abb. 2b, c), ist aber untypisch für die Gattung Stylonychia, die durch ein breiteres Vorderende mit einer wesentlich ausgeprägteren Peristomregion gekennzeichnet ist (Abb. 3 - 9), auch wenn dieses Merkmal im Allgemeinen als variabel angesehen wird.

Tabelle 4: Cilienstrukturen und Länge der morphologisch untersuchten Arten[1)]

Art	DC	CC	LM	RM	FVC[2)]	TC	Länge (µm)[3)]
S. mytilus	5 + 1 unvollst.	3	26 ±1 (18)	38 ±4 (18)	8+5	5-6	300 ± 22 (100-300)
S. lemnae	5 + 1 unvollst.	3	22 ±1	34 ±2	8+5	5	230 ± 12
S. pustulata	4 + 2 unvollst.	3	18 ±2 (20)	27 ±2 (24)	8+5	5	128 ± 17 (150)
S. pusilla	4 + 1-2 unvollst.	3	14 ±1 (12)	19 ±2 (14)	8-9 +5	5	85 ± 8 (75-90)
S. spec.	5 + 1 unvollst.	3	15	26 ±1	8+5, 17	5-7	128 ± 6
O. fallax	?	3	17 (durchgehend)	27	8+5	5	128 (130)
Styx I	viele	-	durchgehend		nicht diff.	12	409 ± 50
Styx II	viele	-	durchgehend		nicht diff.	10	290 ± 40

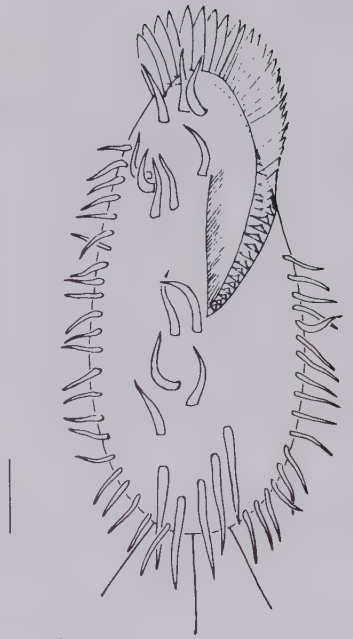
DC = Dorsalcirren
CC = Caudalcirren
LM = linke Marginalcirren
RM = rechte Marginalcirren
FVC = Fronto - Ventral - Cirren
TC = Transversalcirren

1) in Klammer: Angaben bei Kahl, 1932

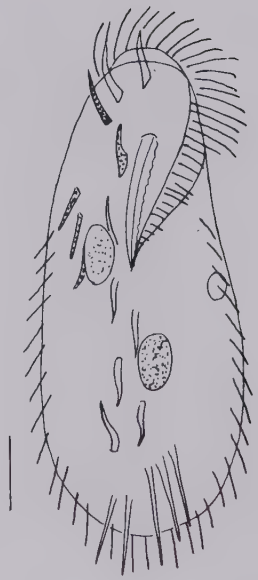
2) Die Fronto - Ventral - Cirren lassen sich oft in Frontal- und Ventralcirren differenzieren (deshalb die Angabe 8+5), nur wenn sie vermehrt vorliegen (z. B. bei *S. spec.*), fällt eine Unterscheidung schwer.

3) ohne Adorale Membranellen und Caudalcirren

a)



b)



c)

Abb. 2 Oxytricha fallax

a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM)

b) gezeichnet nach lichtmikroskopischen (Umriss) und REM - Aufnahmen (Cirren)

c) gezeichnet nach Kahl, 1932

(Maßstab entspricht 20 µm)

Stylonychia mytilus Ehrenberg, 1838 und Stylonychia lemnae Ammermann und Schlegel, 1983 (Abb. 3 + 4): S. mytilus ist seit langem bekannt. Zum ersten Mal wurde von Ammermann (1965) erwähnt, daß diese "Art" aus zwei genetisch isolierten Gruppen besteht, die zunächst, in Anlehnung an Sonneborn (1957), als Syngens bezeichnet und dann als Arten beschrieben wurden (Ammermann und Schlegel, 1983).

Die größere Art (früher Syngen II) behielt dabei den Namen S. mytilus, weil diese durch die weit ausgeschwungene Peristomregion gekennzeichnet ist. Dieser Umriss ist in Ehrenbergs Originalbeschreibung (1938), sowie in der darauffolgenden Literatur so gezeichnet (Borror, 1972; Dragesco, 1966; Grell, 1951; Kahl 1932).

Die kleinere Art erhielt den Namen S. lemnae. Ihre Peristomregion ist weniger weit nach außen geschwungen, die Seiten der Zelle erscheinen daher nahezu parallel. Wenn die Tiere lange gehungert haben, kann sich die Form jedoch so verändern, daß eine Unterscheidung schwierig wird.

Abb. 3 Stylonychia mytilus, ventral (REM)
(Maßstab entspricht 50 µm)

Abb. 4 Stylonychia lemnae, ventral (REM)
(Maßstab entspricht 50 µm)

S. pustulata Ehrenberg 1838 (Abb. 5)

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Stamm ist etwas kleiner als bei Kahl angegeben. Auch ragen mindestens drei der fünf Transversalcirren deutlich über das Hinterende der Zelle. Kahl (1932) erwähnt ausdrücklich, daß bei dieser Art die TVC nicht über das Hinterende der Zelle hinausragen.

Nach dem Kahl'schen Bestimmungsschlüssel könnte es sich deshalb bei der hier bearbeiteten Art auch um S. putrina handeln (s. Abb. 7). Auf jeden Fall halte ich sie für eine Art, die zu der Gattung Stylonychia gehört. Ein Merkmal, das S. pustulata von S. putrina unterscheidet ist die Beschaffenheit der äußeren Cystenwand. Die Ectocyste von S. pustulata ist warzig, die von S. putrina glatt (Kahl, 1932, S. 619). Leider konnte ich bislang keine Cysten in der Kultur beobachten.

S. pusilla Kahl, 1932 (Abb. 6)

Einen Ciliaten habe ich aus einer Rohkultur aus St. Andrews, Schottland, isoliert und zu bestimmen versucht. Aufgrund der Größe, der Peristomform und der auffallend langen Caudalcirren (Abb. 6b) halte ich diese Art für S. pusilla (Kahl, 1932, S. 616, 618, s. Abb. 8).

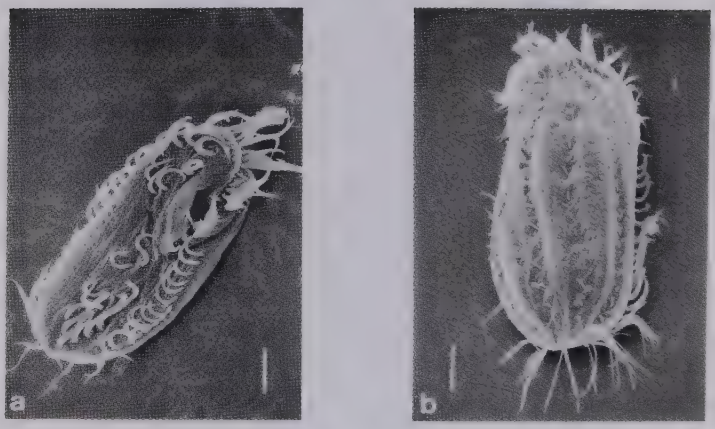


Abb. 5 Stylonychia pustulata, REM (Maßstab entspricht 20 µm)
a) ventral
b) dorsal

Abb. 6 Stylonychia pusilla, REM (Maßstab entspricht 20 µm)
a) ventral
b) dorsal- lateral

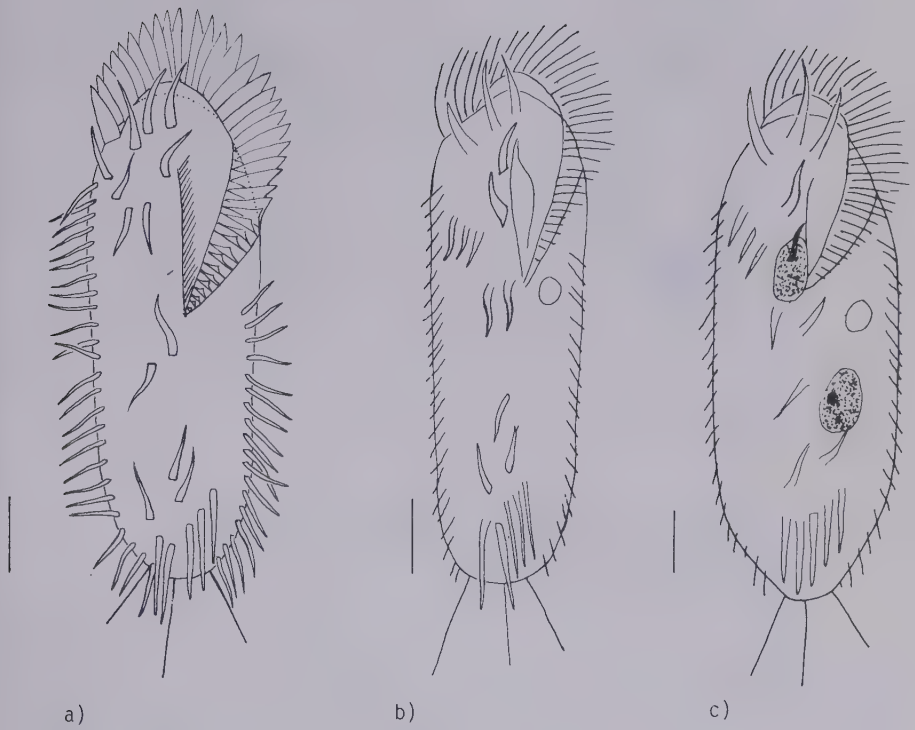
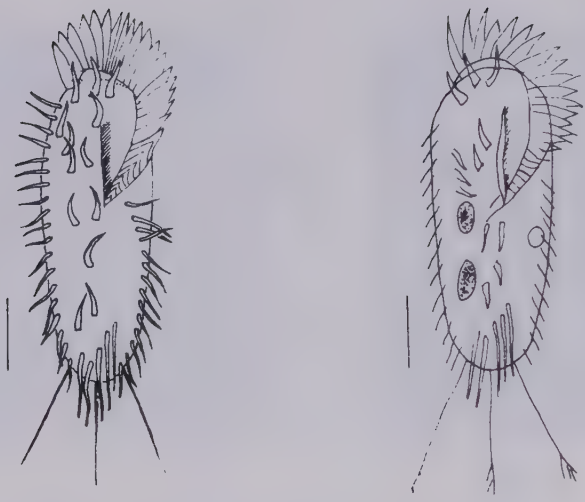


Abb. 7 a) Stylonychia pustulata, Stamm von I. Oka
b) Stylonychia putrina, nach Kahl, 1932
c) Stylonychia pustulata, nach Kahl, 1932
(Maßstab entspricht 20 µm)



a) b)

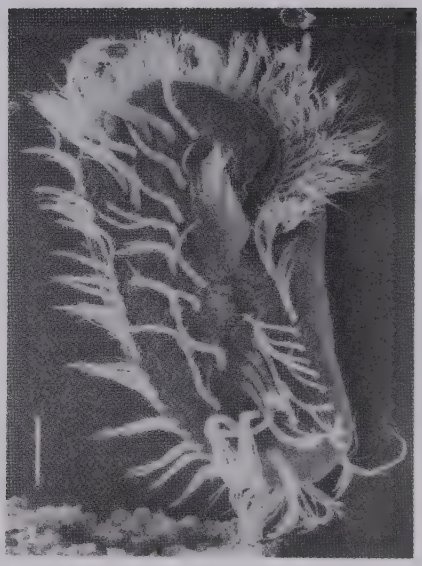
Abb. 8 Stylonychia putrina (Maßstab entspricht 20 µm)
a) untersuchter Stamm (Umriss nach lichtmikroskopischen, Cirren nach REM - Aufnahmen
b) nach Kahl, 1932

S. spec. (Abb. 9)

Diese Art erscheint förmlich als kleine "Ausgabe" von S. mytilus, die geschwungene Peristomform ist sogar noch deutlicher ausgeprägt. Sie ist mit 130 µm jedoch weniger als halb so groß. Diese Art ist häufig und kommt oft zusammen mit anderen Stylonychia - Arten vor. Von den in der Literatur beschriebenen Arten entspricht sie am ehesten der von Gelei (1954) beschriebenen S. claviformis. Diese Art wurde nicht anerkannt sondern mit der "Hungerform" von S. mytilus, wie Kahl (1932, S. 616) sie gezeichnet hat, gleichgesetzt (Borror, 1972). Dragesco (1966) berichtet von einer "petite variété de Thonon" von S. mytilus, die 160 µm groß sei und die der hier angeführten Art gleicht.

Es besteht jedoch kein Zweifel, daß es sich bei der untersuchten S. spec. um eine eigene Art handelt. Kreuzungsexperimente ergaben eindeutig, daß sie gegen S. mytilus genetisch isoliert ist. Zellgröße u. Zellform sind konstante Merkmale.

Ich habe diese Art Herrn Borror zum Bestimmen geschickt (ebenso S. pusilla zur Überprüfung meiner Bestimmungsversuche). Bei Abschluß dieser Arbeit lag von ihm noch keine Stellungnahme vor.



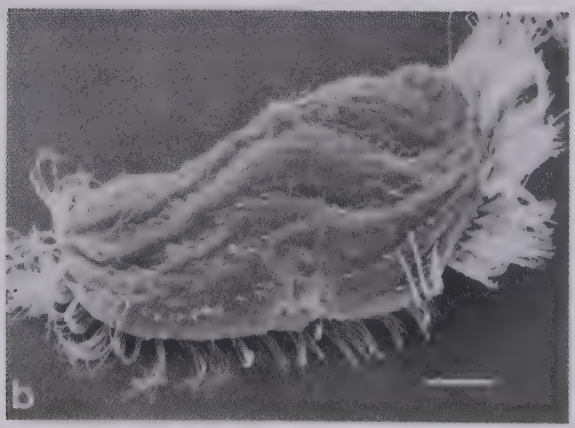


Abb. 9 Stylonychia spec., REM
a) ventral
b) dorsal- lateral.
(Maßstab entspricht 20 µm)

Die taxonomisch wichtigen Cilienstrukturen sind anscheinend innerhalb der Familie Oxytrichidae sehr konstant (Zahl der Dorsal-, Caudal-, Transversal- und Frontoventralcirren), die variablen (linke, rechte Marginalcirrenreihe) sind offensichtlich nicht artspezifisch. So sind z. B. S. pustulata, S. spec. und O. fallax gleich lang und haben fast dieselbe Anzahl linker und rechter Marginalcirren.

Es gilt zumindest für die hier untersuchten Arten, daß sie sich anhand dieser "taxonomisch wichtigen Cilienstrukturen" nicht bestimmen lassen.

3.1.2 Urostylidae

Die beiden unbestimmten Klone, die von Prof. Prescott zur Verfügung gestellt wurden, lassen sich mit einiger Sicherheit in die Familie Urostylidae einordnen: Die Ventralcirren stehen in mehreren Reihen (ca. 10) und sind nicht in Fronto-Ventral-Cirren differenziert (Borror, 1972). Allerdings läßt sich eindeutig eine geschlossene Marginalcirrenreihe feststellen.

Dagegen lassen sie sich keiner der von Borror (1972, 1979) angeführten Gattungen zuordnen. Ebenso weisen sie einige Besonderheiten auf, die ich in der Literatur bis jetzt nicht gefunden habe: der größere Organismus besitzt dorsal drei spitzige Höcker (Abb. 10), der kleinere zwei (Abb. 11). Diese Erhebungen sind so deutlich, daß man sie im Binokular sehen kann. Außerdem haben beide einen kurzen "Schwanz". In der Größe sind sie außerordentlich variabel (s. Tab. 4), in der Kultur findet man meistens einige große Zellen neben vielen kleinen.

Diese Eigenschaften legen den Schluß nahe, daß es sich nicht nur um neue Arten, sondern sogar um eine neue Gattung handelt. Bislang werden die beiden Klone von Prof. Prescott mit den "Labornamen" "Styx I" für den größeren und "Styx II" für den kleineren Klon bezeichnet. Diese Bezeichnung will ich vorerst ebenfalls beibehalten.

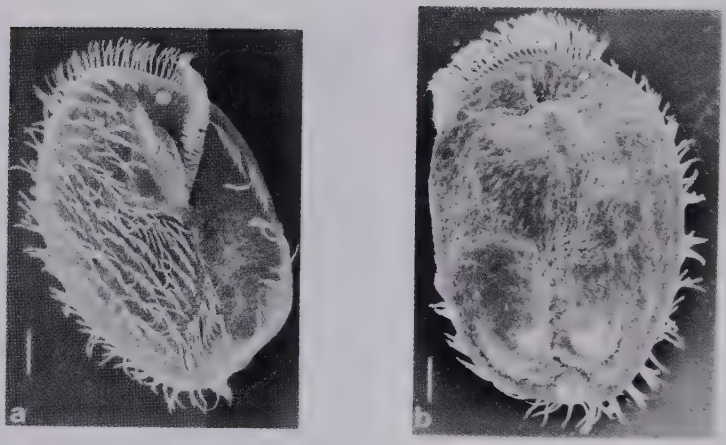


Abb. 10 Styx I, REM, a) ventral b) dorsal
(Maßstab entspricht 50 µm)

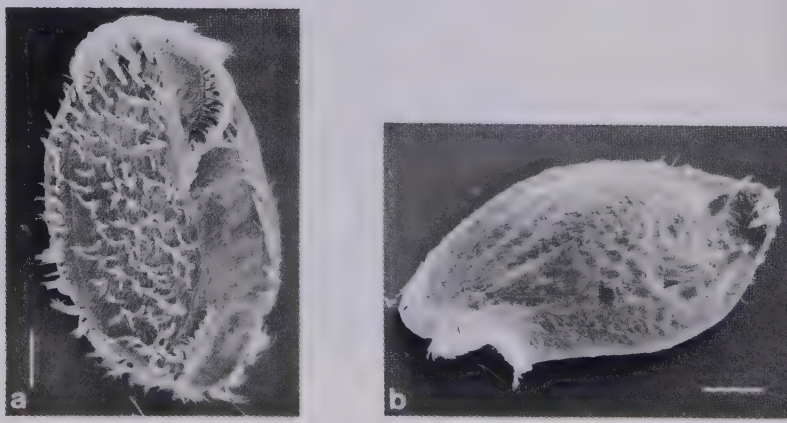


Abb. 11 Styx II, REM, a) ventral b) dorsal
(Maßstab entspricht 50 µm)

3.2. Enzym - Elektrophorese

Die Enzymbanden der untersuchten Arten sind schematisch in den Abb. 15 bis 28 dargestellt. Im Folgenden soll zuerst auf die Besonderheiten von zwei Enzymen eingegangen werden.

3.2.1 Amylase

Bei den verschiedenen Arten werden 2, 3 oder 4 Banden beobachtet. Bei fast allen Arten lassen sich Banden mit starker und wesentlich schwächerer Enzymaktivität unterscheiden (Abb. 12). Hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Es handelt sich bei den verschieden stark reagierenden Enzymen um Isoenzyme (Isoenzyme sind Enzymproteine, die dieselbe chem. Reaktion katalysieren, jedoch von verschiedenen Loci codiert werden. Im Gegensatz hierzu werden Enzymproteine, die von verschiedenen Allelen eines Locus codiert werden, Allozyme genannt). Für diese Annahme spricht, daß für beide Bandenmuster unabhängige Varianten auftreten (Abb. 21, O. fallax, Styx I und Styx II). Von Drosophila ist zudem bekannt, daß Amylase ein monomeres Protein ist (Doane, 1969) und zwei Isoenzyme vorhanden sind (Bahn, 1967). Nimmt man an, daß bei Ciliaten ebenfalls ein Monomer vorliegt, lassen sich Enzymmuster mit drei oder vier Banden nicht erklären ohne die Annahme, daß es sich um Isoenzyme handelt. Allozyme können als monomere Proteine nur eine Bande (homozygot) oder zwei Banden (heterozygot) aufweisen. Zudem ist es unwahrscheinlich, daß bei 19 untersuchten Stämmen, die von S. lemnae untersucht wurden, nur Heterozygote gefunden wurden (Abb. 21).

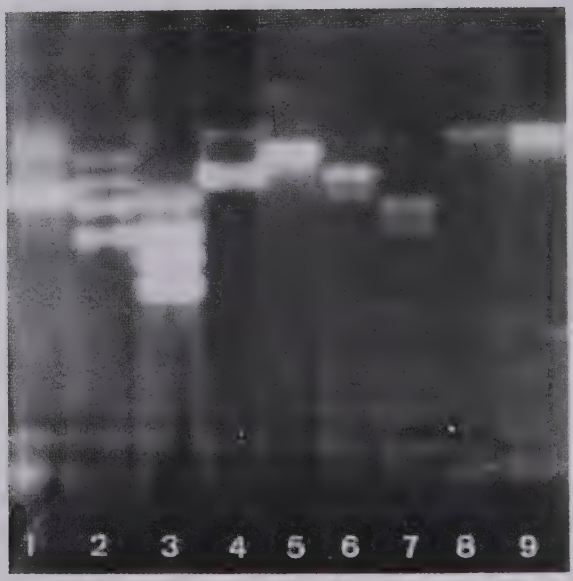


Abb. 12 α-Amylase; Position 1: O. fallax; Pos. 2: S. spec.; Pos. 3: S. pusilla; Pos. 4: S. pustulata; Pos. 5 - 7: S. lemnae; Pos. 8 u. 9: S. mytilus

2. Es handelt sich nicht um Isoenzyme sondern um posttranslationale Konformationsänderungen. Dabei wird bei einem Teil der Proteinmoleküle, die das Produkt eines Locus sind, die Ladung und damit die Mobilität im Gel verändert, wodurch zusätzliche Banden entstehen (Baker et. al., 1966; Stratil, 1967). Hierfür spricht, daß die schwächer reagierenden Enzymbanden bei S. mytilus, S. lemnae und S. spec. immer den gleichen Abstand zu den stark reagierenden Enzymbanden einnehmen.

Bevor nicht eindeutig geklärt ist, ob es sich um Isoenzyme oder um posttranslationale Konformationsänderungen handelt, sollen bei den weiteren Überlegungen nur die stark färbenden Enzymbanden als Allozyme eines Locus betrachtet werden.

3.2.2. Isocitratdehydrogenase

Drei von 44 untersuchten Stämmen von S. mytilus zeigen im langsamer wan-

dernden Enzym (Idh I) ein heterozygotes Bandenmuster. Dabei komigriert die langsame Bande mit der Idh I - Bande von S. lemnae (Abb. 13). Dies läßt die Annahme zu, daß das Allel, das bis jetzt bei S. lemnae ausschließlich gefunden wurde, als seltenes Allel bei S. mytilus ebenfalls vorkommt. Alle drei Klone wurden aus dem Hirschauer Baggerteich isoliert. Zwei der heterozygoten Stämme haben ein Drei-Banden-Muster mit einer deutlich verstärkten mittleren Bande, was für einen dimeren Aufbau des Proteins spricht (Ferguson, 1980; Rider und Taylor, 1980). Ein Stamm (H - 2) zeigt diese Hybridbande jedoch nicht.

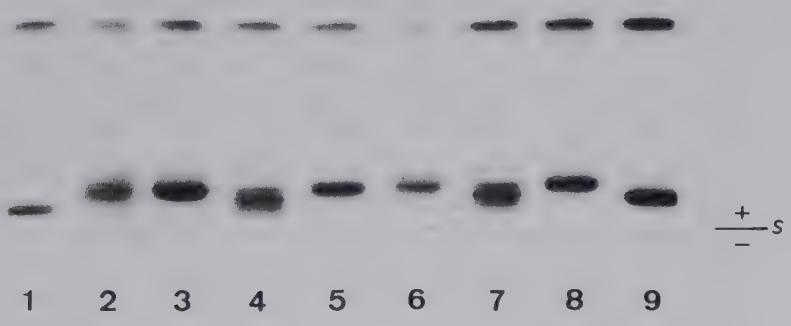


Abb. 13 Idh; Position 1 u. 9: S. lemnae; Position 2, 3, 5, 6, 8: S. mytilus, homozygote Stämme; Position 4 u. 7: heterozygote Stämme

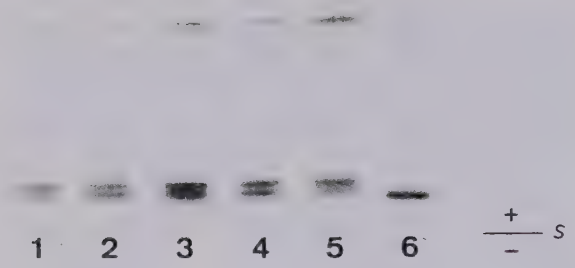
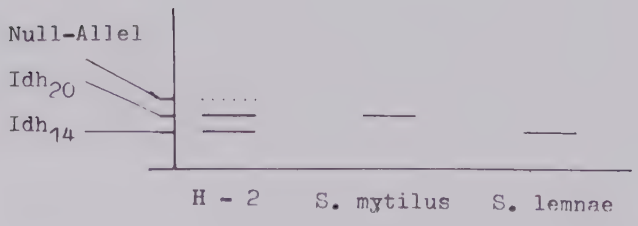


Abb. 14 Idh; Position 1: Stamm H - 2; Position 2 - 4 : Subklone von Stamm H - 2; Position 6 = S. lemnae

Es war naheliegend, anzunehmen, daß eine Kontamination der Kultur mit S. lemnae für dieses ungewöhnliche Muster verantwortlich war. Fünf getestete Subklone zeigten jedoch wiederum zwei Idh - Banden (Abb. 14), so daß eine Kontamination dieser Kultur mit S. lemnae ausgeschlossen werden konnte. Zweifelsfrei gehört dieser Stamm zu S. mytilus, da alle anderen Enzyme die für diese Art charakteristischen Positionen zeigen (s. Anhang: Bestimmungsschlüssel für die Stylonychia - Gruppe). Es ist denkbar, daß hier ein anderes Idh_{14} oder Idh_{20} Allel vorliegt als bei den Stämmen mit Hybridbande. Die von diesem Allel codierte Untereinheit müßte, ohne seine Gesamtladung verändert zu haben, so umgebaut sein, daß sie mit der Untereinheit des anderen Allels kein funktionsfähiges Heterodimer ergibt, bzw. dieses unter den gegebenen Versuchsbedingungen inaktiv ist. Es wäre auch möglich, daß dieser Stamm heterozygot für Idh_{14} und ein Null - Allel ist. Die Enzymbande in der Idh_{20} Position wäre dann ein Heterodimer aus der funktionsfähigen Idh_{14} und einer funktionsunfähigen Untereinheit:



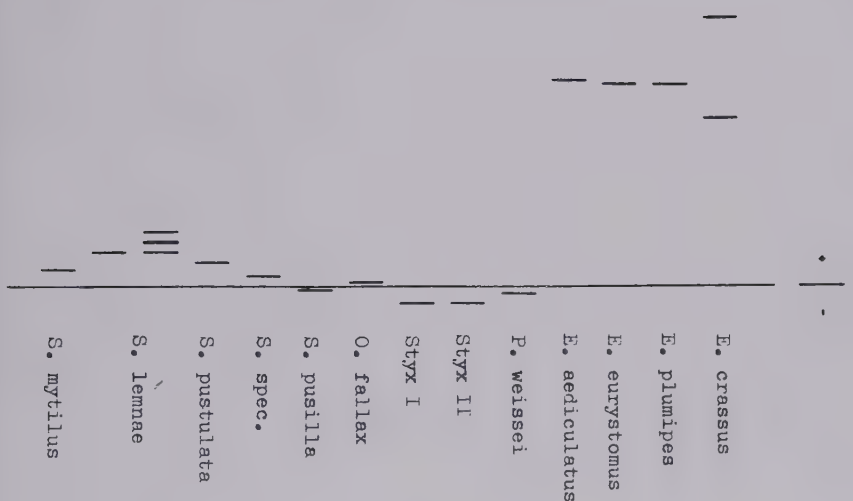


Abb. 15 Malatdehydrogenase

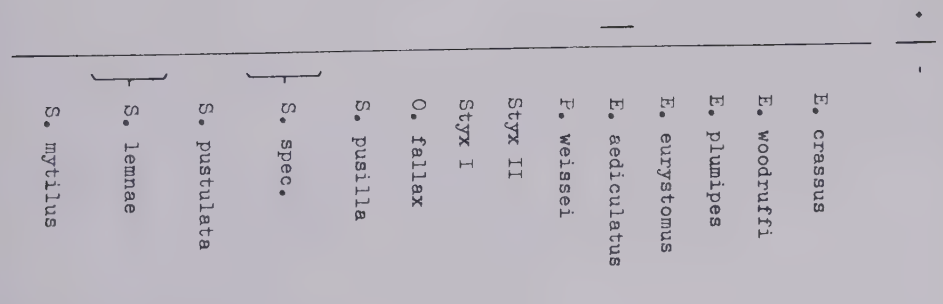


Abb. 16 "Malic enzyme"

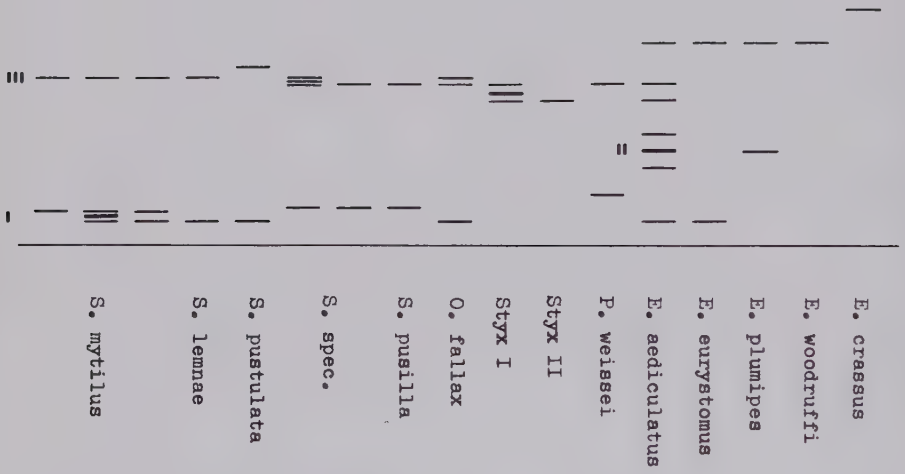


Abb. 17 Isocitratdehydrogenase

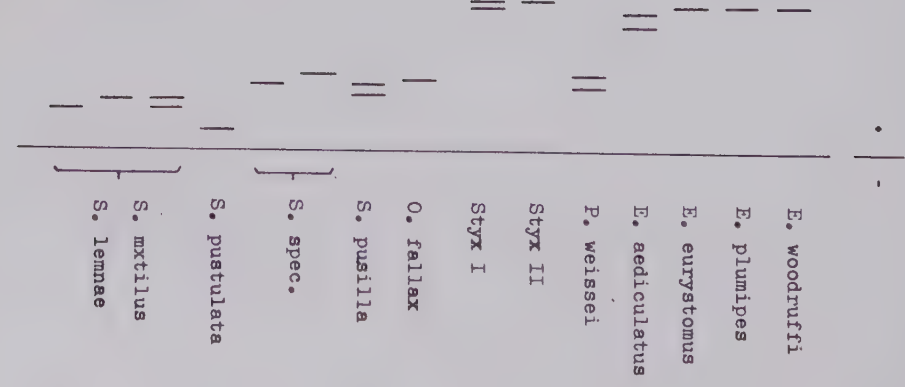


Abb. 18 Cytochrom b_5 Reductase

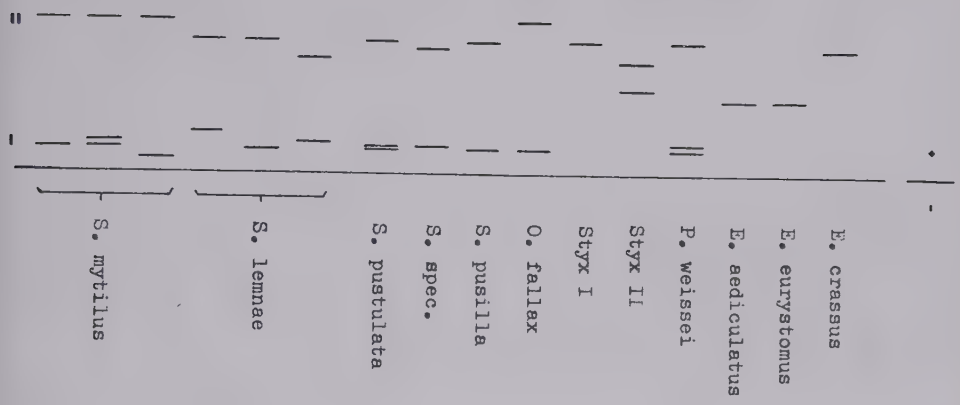


Abb. 19 Alanin Aminotransferase

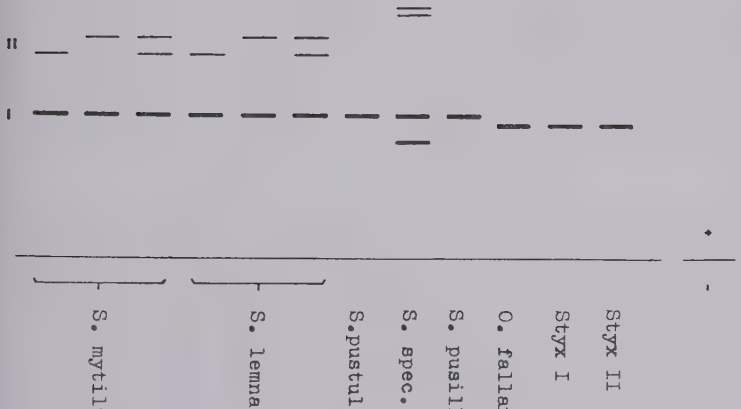


Abb. 20 Esterase, unspezifisch

Abb. 21 α-Amylase

Abb. 22 Peptidase I, II u. III

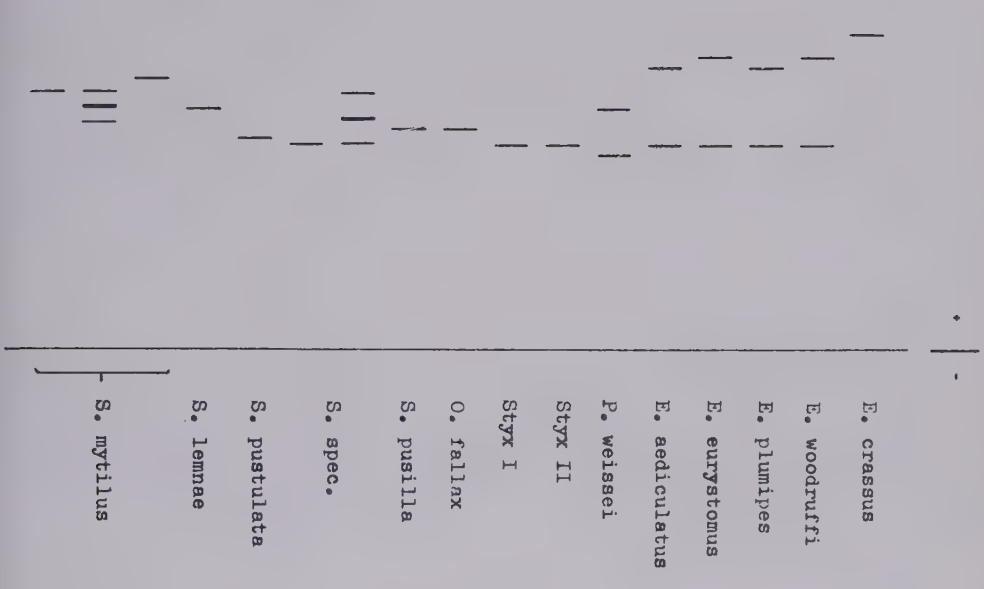


Abb. 23 Peptidase IV

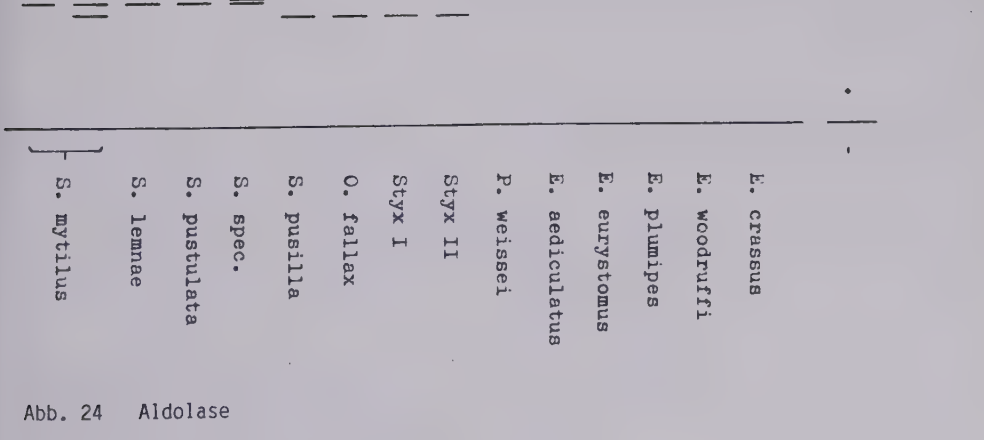


Abb. 24 Aldolase

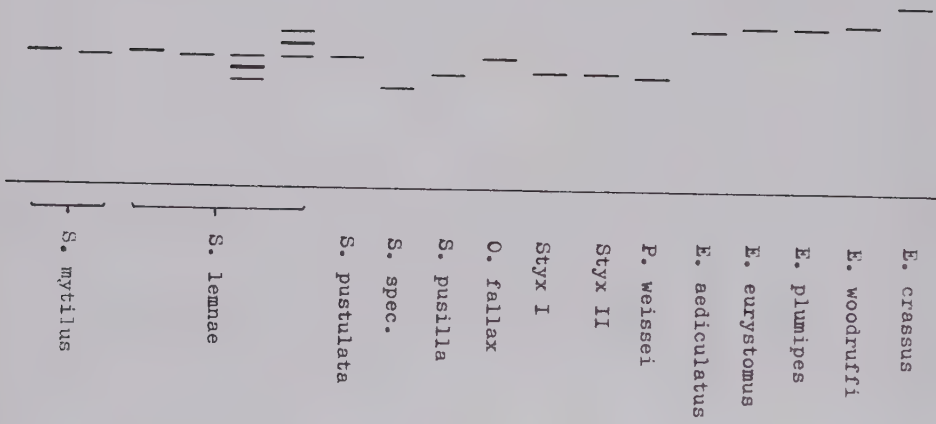


Abb. 25 Glucosephosphat Isomerase

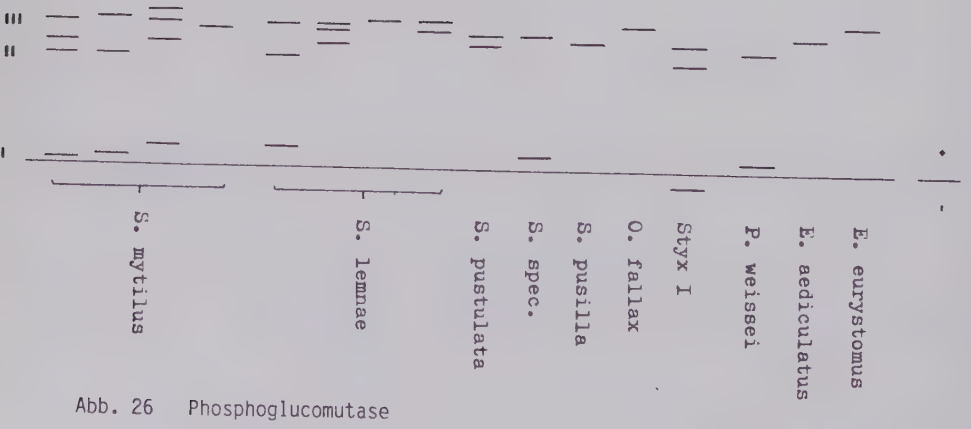


Abb. 26 Phosphoglucomutase

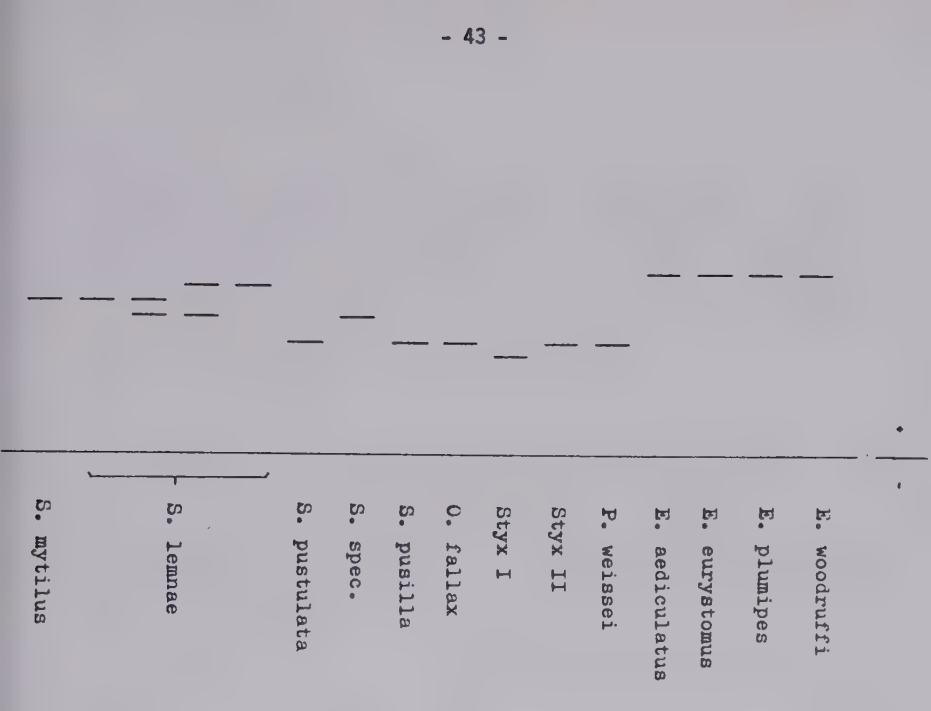


Abb. 27 Superoxid Dismutase

Abb. 28 Threonindehydrogenase

3.2.3. Allozympolymorphismus

Ein Maß für die genetische Variabilität in einer sexuell reproduzierenden Art ist die durchschnittliche Frequenz des jeweils häufigsten Allels sowie die theoretisch erwartete, aus den Allelfrequenzen errechnete Heterozygotenhäufigkeit (Ayala, 1982). Die Frequenz eines Allels ergibt sich aus folgender Formel:

$$F = \frac{2\,Ho + 1\,He}{2\,N}$$

Ho = Zahl der Homozygoten für dieses Allel
He = Zahl der Heterozygoten für dieses Allel
N = Zahl der untersuchten Individuen (Stämme)

Die errechnete Heterozygotenhäufigkeit für jeden Locus bei Panmixie ist:

$$H_L = 1 - \sum_{i=1}^{n} x_i^2$$

x = Allelfrequenzen (1 - n)

Die durchschnittliche erwartete Heterozygotenhäufigkeit $\overline{H}$ ergibt sich aus der Summe aller H_L - Werte, einschließlich der monomorphen Loci ($H_L = 0$), geteilt durch die Anzahl der getesteten Loci (Ferguson, 1980, S. 162, 163). Die beobachtete Heterozygotenhäufigkeit ist die Zahl der heterozygoten Individuen, geteilt durch die Zahl der untersuchten Individuen.

Die für die untersuchten Arten beobachteten Allelfrequenzen sind in den Tabellen 5 und 6 wiedergegeben. In Tabelle 7 sind die erwarteten (Spalte 4 und 6) und die tatsächlich beobachteten Heterozygotenhäufigkeiten (Spalte 5 und 7) von S. mytilus und S. lemnae aufgeführt, da bei diesen Arten eine größere Zahl von Stämmen getestet werden konnte.

3.2.4. Genetische Identität

Bei der von Nei (1972) entwickelten statistischen Methode wird, basierend auf dem Vergleich von Proteinen, die Zahl der unterschiedlichen Codons pro Gen zwischen zwei Arten, oder Populationen, geschätzt und in Form eines Identitätswertes ausgedrückt. Der Identitätswert eines Locus (I = genetische Identität) reicht von 0 (keine gemeinsamen Allele für diesen Locus) bis 1 (dieselben Allele mit gleichen Frequenzen) und wird nach folgender Formel berechnet:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i \cdot y_i}{(\sum x_i^2 \cdot \sum y_i^2)^{1/2}}$$

x = Allelfrequenzen (1 - n) der Art X
y = Allelfrequenzen (1 - n) der Art Y

Die mittlere genetische Identität ($\bar{I}$) ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel der I - Werte aller untersuchten Loci.

Tab. 5 Allelfrequenzen von 24 Loci bei sechs Arten der Familie Oxytrichidae

Enzym-Loci	Allel	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	O. fallax	Styx I	Styx II	P. weissei
AcPh	94	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	0.66	0.115	-	-	-	-	-	-	-
	106	0.30	0.885	-	-	-	-	-	-	-
n		50	52							
Ald.	88	-	-	-	-	1.00	1.00	0.50	0.50	-
	90	0.025	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	0.975	1.00	1.00	0.80	-	-	-	-	-
	103	-	-	-	0.20	-	-	-	-	1.00
	110	-	-	-	-	-	-	0.50	0.50	-
n		40	42	2	10	2	2	2	2	4
Amy	68	-	-	-	-	0.50	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-	-	0.50	0.50	-
	74	-	-	-	-	0.50	-	-	-	-
	76	-	-	-	-	-	-	0.50	0.50	-
	79	-	-	-	0.40	-	-	-	-	-
	85	-	0.395	-	0.50	-	-	-	-	-
	89	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-
	91	-	-	-	0.10	-	-	-	-	-
	92	-	0.579	1.00	-	-	-	-	-	-
	97	0.125	-	-	-	-	-	-	-	-
	98	-	0.026	-	-	-	-	-	-	-
	100	0.875	-	-	-	-	-	-	-	-
n		32	38	2	10	2	2	2	2	
Dia I	40	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-
	85	0.34	0.11	-	-	-	-	-	-	-
	100	0.66	0.89	-	-	-	-	-	-	-
	110	-	-	-	-	0.50	-	-	-	-
	127	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25
	130	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-
	142	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-
	150	-	-	-	0.20	0.50	-	-	-	0.75
n		38	36	2	10	2	2	-	-	4

Enzym-Locus	Allel	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	O. fallax	Styx I	Styx II	P. weissei
Dia. II	284	-	-	-	-	-	-	0.50	-	-
	295	-	-	-	-	-	-	0.50	1.00	-
n								2	2	
Est. I	54	-	-	-	0.50	-	-	-	-	-
	61	-	-	-	-	-	1.00	1.00	1.00	-
	66	1.00	1.00	1.00	0.50	1.00	-	-	-	-
n		48	46	2	4	2	2	2	2	
Est. II	89	0.125	0.91	1.00	-	-	-	-	-	-
	100	0.875	0.09	-	-	-	-	-	-	-
	110	-	-	-	0.50	-	-	-	-	-
	114	-	-	-	0.50	-	-	-	-	-
n		48	48	2	4					
Gdh	80	0.64	0.35	-	-	-	-	-	-	-
	100	0.36	0.65	-	-	-	-	-	-	-
	243	-	-	-	-	-	-	1.00	1.00	-
n		34	26					2	2	
Alat I	8	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	0.67	0.23	0.50	-	1.00	1.00	-	-	0.50
	18	-	-	0.50	1.00	-	-	-	-	-
	20	0.25	0.69	-	-	-	-	-	-	0.50
	27	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-
n		24	24	2	8	2	2	2	2	2
Alat II	55	-	-	-	-	-	-	-	0.50	-
	73	-	-	-	-	-	-	-	0.50	-
	75	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-
	82	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-
	86	-	0.96	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00
	100	1.00	-	-	-	-	1.00	-	-	-
n		54	48	2	10	2	2	2	2	2

Enzym-Locus	Allel	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	O. fallax	Styx I	Styx II	P. weissei
Idh I	14	0.02	1.00	-	-	-	1.00	-	-	-
	14a	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	0.97	-	1.00	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	1.00	1.00	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
n		88	92	2	22	2	2	2	2	4
Idh III	85	-	-	-	-	-	-	0.50	1.00	-
	95	-	-	-	0.86	1.00	0.50	0.50	-	1.00
	100	1.00	1.00	-	0.14	-	0.50	-	-	-
	105	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-
n		88	92	2	22	2	2	2	2	2
Mdh I	-100	-	-	-	-	-	-	1.00	1.00	-
	- 30	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
	- 20	-	-	-	-	1.00	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-
	50	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-
	100	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-
	140	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-
	200	-	0.99	-	-	-	-	-	-	-
	340	-	0.01	-	-	-	-	-	-	-
n		70	94	2	8	2	2	2	2	4
Me II	85	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
	90	-	-	1.00	0.29	-	0.50	-	-	-
	95	-	-	-	-	-	-	1.00	1.00	-
	97	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
	100	1.00	0.02	-	0.71	-	-	-	-	-
	105	-	0.98	-	-	-	-	-	-	-
	130	-	-	-	-	1.00	-	-	-	-
n		72	84	2	14	2	2	2	2	4

Enzym-Locus	Allel	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	o. fallax	Styx I	Styx II	P. weissei
Pept Ia	72	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
	77	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-	-	0.50	-	-
	84	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
	85	-	-	-	0.40	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-
	91	-	0.86	-	-	-	-	-	-	-
	95	-	-	1.00	0.50	1.00	-	0.50	-	-
	97	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-
	100	1.00	0.06	-	-	-	-	-	-	-
	105	-	-	-	0.10	-	-	-	-	-
n		50	36	2	10	2	2	2	2	4
Pept. II	63	-	-	-	-	0.50	-	-	-	-
	68	-	-	-	0.50	-	-	-	-	-
	70	0.32	0.71	1.00	-	-	-	-	-	-
	71	-	-	-	-	0.50	-	-	-	-
	72	0.68	0.29	-	-	-	1.00	-	-	-
	76	-	-	-	0.50	-	-	-	-	-
n		50	34	2	8	2	2			
Pept. III	30	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-
	35	0.67	0.07	-	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
	42	0.33	0.80	-	-	1.00	-	-	-	-
	44	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
	47	-	0.13	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-
	54	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
n		42	30	2	8	2	2	2	2	4
Pept. IVa	76	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
	80	-	-	-	0.88	-	-	1.00	1.00	-
	82	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-
	86	-	-	-	-	1.00	1.00	-	-	-
	88	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-

Enzym-Locus	Allel	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	O. fallax	Styx I	Styx II	P. weissei
Pept. IVa	93	-	1.00	-	-	-	-	-	-	-
	94	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
	100	0.91	-	-	0.12	-	-	-	-	
	105	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-
n		34	20	2	8	2	2	2	2	4
Pgi	75	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-
	80	-	0.053	-	-	-	-	-	-	-
	86	-	-	-	-	1.00	-	-	-	1.00
	88	-	-	-	-	-	-	1.00	1.00	-
	98	0.09	0.605	1.00	-	-	1.00	-	-	-
	100	0.91	0.316	-	-	-	-	-	-	-
	116	-	0.026	-	-	-	-	-	-	-
n		46	38	2	10	2	2	2	2	4
Pgm I	-10	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-
	4	0.29	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	0.57	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
	9	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-
	13	0.14	1.00	-	-	-	-	-	-	-
n		14	16		4			2		2
Pgm II	77	0.83	0.27	-	-	-	-	-	-	-
	87	0.17	0.73	-	-	-	-	-	-	-
n		42	26							
Pgm III	75	-	-	-	-	-	-	0.50	-	-
	83	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
	86	-	-	0.50	-	-	-	0.50	-	-
	89	-	-	-	-	1.00	-	-	-	-
	93	-	-	0.50	1.00	-	-	-	-	-
	96	0.03	0.10	-	-	-	-	-	-	-
	100	0.92	0.71	-	-	-	1.00	-	-	-

Enzym-Locus	Allel	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	O. fallax	Styx I	Styx II	P. weissei
Pgm III	102	0.03	0.19	-	-	-	-	-	-	-
	106	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
n		66	52	2	8	2	2	2	2	4
Sdm	65	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-
	75	-	-	1.00	-	1.00	1.00	-	1.00	1.00
	90	-	0.118	-	1.00	-	-	-	-	-
	100	1.00	0.735	-	-	-	-	-	-	-
	110	-	0.147	-	-	-	-	-	-	-
n		36	34	2	12	2	2	2	2	4
Tdh	50	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25
	70	-	-	-	-	-	-	1.00	1.00	-
	78	-	-	-	0.20	-	-	-	-	-
	80	-	0.07	-	-	-	-	-	-	-
	85	-	-	-	-	-	-	-	-	0.75
	100	1.00	0.91	-	-	-	1.00	-	-	-
	120	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-
n		58	46	2	10	2	2	2	2	4

n = Zahl der untersuchten Gene

Tab. 6 Allelfrequenzen von 19 Loci bei fünf Arten der Familie Euplotidae

Enzym-Locus	Allel	E. aediculatus	E. eurystomus	E. plumpies	E. woodruffi	E. crassus
Ald. +)	116	1.00	1.00	1.00	1.00	-
	140	-	-	-	-	1.00
Dia. II +)	247	0.50	-	-	-	-
	273	0.50	-	-	-	-
	286	-	1.00	1.00	1.00	-
Alat II	52	1.00	1.00	-	-	-
	82	-	-	-	-	1.00
Idh I	14	1.00	-	1.00	-	-
Idh II	45	0.50	-	-	-	-
	55	-	-	1.00	-	-
	65	0.50	-	-	-	-
Idh III	85	0.50	-	-	-	-
	95	0.50	-	-	-	-
Idh IV +)	120	1.00	1.00	1.00	1.00	-
	140	-	-	-	-	1.00
Mdh II	1000	-	-	-	-	1.00
Mdh III +)	1200	-	1.00	1.00	-	-
	1220	1.00	-	-	-	-
	1600	-	-	-	-	1.00
Me I	57	-	-	-	0.50	-
	72	-	-	-	0.50	-
Me III +)	165	-	1.00	1.00	-	-
	170	1.00	-	-	-	-
	185	-	-	-	-	1.00
Pept. Ia +)	85	1.00	1.00	1.00	1.00	-
Pept. Ib +)	110	1.00	1.00	1.00	1.00	-
	120	-	-	-	-	1.00
Pept. IVa +)	80	1.00	1.00	1.00	1.00	-
Pept. IVb +)	110	1.00	-	1.00	-	-
	114	-	1.00	-	1.00	-
	124	-	-	-	-	1.00

Enzym-Locus	Allel	E. aediculatus	E. eurystomus	E. plumpies	E. woodruffi	E. crassus
Pgi +)	120	1.00	-	-	-	-
	123	-	1.00	1.00	-	-
	126	-	-	-	1.00	-
	140	-	-	-	-	1.00
Pgm III	93	1.00	-	-	-	-
	102	-	1.00	-	-	-
Sdm +)	120	1.00	1.00	1.00	1.00	-
n		32	26	26	20	18

+) zur Errechnung des $\bar{I}$ - Wertes verwendete Enzyme

n = Zahl der untersuchten Gene

Tab. 7 Intraspezifische (Spalte 2 - 6) und Interspezifische (Spalte 7) Variabilität in der Gattung Stylonychia

Locus	Frequenz des häufigsten Allels		Heterozygotie				Ø genetische Identität[1)]
			S. mytilus		S. lemnae		
	S. mytilus	S. lemnae	erw.	beob.	erw.	beob.	
AcPh	0.66	0.885	0.472	0.12	0.204	0.087	---
Ald	0.975	1.00	0.05	0.05	0	0	0.45
Amy	0.875	0.579	0.218	0	0.508	0.158	0.074
Dia	0.66	0.89	0.448	0.079	0.196	0.222	0.064
Est I	1.00	1.00	0	0	0	0	0.582
Est II	0.875	0.91	0.218	0.208	0.164	0.167	0.263
Gdh	0.64	0.65	0.46	0.059	0.455	0.692	---
Alat I	0.67	0.69	0.483	0.083	0.465	0	0.424
Alat II	1.00	0.96	0	0	0.076	0	0.265
Idh I	0.97	1.00	0.059	0.068	0	0	0.203
Idh III	1.00	1.00	0	0	0	0	0.317
Mdh I	1.00	0.99	0	0	0.02	0.021	0
Me	1.00	0.98	0	0	0.02	0.048	0.134
Pept Ia	1.00	0.86	0	0	0.25	0.167	0.159
Pept II	0.68	0.71	0.436	0	0.412	0	0.234
Pept III	0.67	0.80	0.442	0	0.338	0	0.122
Pept IVa	0.91	1.00	0.167	0.059	0	0	0.079
Pgi	0.91	0.605	0.164	0	0.531	0.158	0.207
Pgm I	0.57	1.00	0.571	0	0	0	---
Pgm II	0.83	0.73	0.282	0.048	0.394	0.077	---
Pgm III	0.92	0.71	0.151	0.121	0.450	0.096	0.229
Sdm	1.00	0.735	0	0	0.424	0.235	0.277
Tdh	1.00	0.91	0	0	0.167	0.087	0.535
Ø	0.862	0.852	0.201	0.039	0.221	0.096	
	± 0.152	± 0.145					
Zahl der unters. Gene			546		506		

1) S. mytilus - O. fallax

Mit der genetischen Distanz D = - ln I ($\overline{D}$ = - ln $\overline{I}$) wird die durchschnittliche Zahl der Codon - Substitutionen pro Locus geschätzt, die stattgefunden haben, seit sich zwei Taxa getrennt haben. Der Wert von D kann größer 1 werden, weil 2 oder mehr Codon - Substitutionen an einem Locus stattgefunden haben können seit der Trennung zweier Taxa.

3.2.4.1. Genetische Identität zwischen den untersuchten Arten der Gattung Stylonychia und O. fallax

In Tabelle 8 sind die Werte für die sechs untersuchten Arten aufgeführt, wobei jeweils alle Enzym-Loci berücksichtigt wurden, die zwischen zwei Arten verglichen werden konnten. Mit Hilfe der UPGMA - Methode (unweighted pair group analysis by means of arithmetic, Sneath and Sokal, 1973) wurde anhand dieser $\overline{I}$ - Werte ein Dendrogramm konstruiert (Abb. 29). Bei dieser Methode werden zuerst die beiden Arten mit dem höchsten $\overline{I}$ - Wert in ein Diagramm eingezeichnet (z. B. Art A und Art B). Der Verzweigungspunkt wird dabei, entsprechend einer Skala von 0 bis 1, in Höhe des $\overline{I}$ - Wertes gelegt. Weiterhin werden die beiden Arten als Einheit betrachtet (A/B) und für alle weiteren Arten neue $\overline{I}$ - Werte zu dieser Einheit errechnet. Diese ergeben sich aus den arithmetischen Mitteln der zuerst errechneten $\overline{I}$ - Werte (z. B. neuer $\overline{I}$ - Wert Art C zur Gruppe A/B = erster $\overline{I}$ - Wert Art C zu Art A + erster $\overline{I}$ - Wert Art C zu Art B, geteilt durch zwei). Besteht der höchste $\overline{I}$ - Wert jetzt zwischen einer weiteren Art und der schon eingetragenen Einheit (A/B), so wird diese angegliedert und die Einheit erweitert (A/B/C). Besteht der höchste $\overline{I}$ - Wert zwischen zwei weiteren Arten (z. B. zwischen C und D), werden diese in das Diagramm eingetragen und als zweite Einheit (C/D) betrachtet. Wiederum werden neue $\overline{I}$ - Werte berechnet. Dieses Verfahren wird solange wiederholt, bis alle Arten zugeordnet sind. Um eine Vorstellung über die Intraspezifische Variabilität eines jeden untersuchten Locus zu bekommen, wurden für jeden Locus die $\overline{I}$ - Werte über alle Arten berechnet (siehe z. B. Tabelle 7, Spalte 7). Dabei zeigt sich, daß einige der untersuchten Loci sehr niedrige $\overline{I}$ - Werte aufweisen (Amy, Dia, Mdh, Pept. IV). Loci mit sehr geringen und sehr hohen $\overline{I}$ - Werten bieten für Untersuchungen über Verwandtschaftsbeziehungen wenig Information, da nicht die absolute genetische Divergenz, sondern die relative genetische Verschiedenheit

zwischen Arten untersucht wird (Pinsker und Buruga, 1982). Zudem ist die Wahrscheinlichkeit bei sehr niedrigen $\overline{I}$ - Werten erhöht, daß diese im Bereich der zufälligen Identität liegen (s. Kap. 4.4).

Es wurden deshalb für eine zweite Rechnung 15 Loci ausgewählt, deren mittlere genetische Identität größer als 0.1 ist. Die daraus gewonnenen Werte sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Für die Enzyme Tdh und Est II liegen bei einigen Arten keine Daten vor (s. Tab. 5). Wird bei dem paarweisen Vergleich von Arten nicht die gleiche Zahl von Loci berücksichtigt (wie z. B. in Tab. 8 und Abb. 29), können dadurch die $\overline{I}$ - Werte verfälscht werden. So trägt z. B. ein Locus mit geringer zwischenartlicher Variabilität zwischen zwei Arten zu einer erhöhten genet. Identität bei. Fehlt dieser Locus beim Vergleich mit einer dritten Art, ist zu dieser die Identität geringer, aufgrund der fehlenden Information und nicht aufgrund einer aufgedeckten genetischen Verschiedenheit. Um jedoch die Information der beiden Loci nicht zu verlieren und oben genannte Verfälschung zu verringern, wurden für die fehlenden $\overline{I}$ - Werte jene $\overline{I}$ - Werte eingesetzt, die sich aus dem Mittel der vergleichbaren Arten ergeben.

Anhand dieser Identitäts - Matrix (Tab. 9) wurde wiederum ein Dendrogramm konstruiert (Abb. 30). Insgesamt ergeben sich etwas höhere Identitätswerte als bei dem ersten Vergleich. Bei beiden Dendrogrammen fällt jedoch auf, daß O. fallax nicht abseits der Stylonychia - Arten steht, sondern zu ihnen eine ähnliche genetische Identität aufweist wie sie diese untereinander zeigen.

Tab. 8 Genetische Identität ($\overline{I}$, oberhalb Diagonale) und genetische Distanz ($\overline{D}$, unterhalb Diagonale) zwischen sechs Arten der Familie Oxytrichidae (Zahl der berücksichtigten Loci in Klammer)

	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	O. fallax
S. mytilus	---	0.490 (23)	0.238 (19)	0.140 (20)	0.134 (17)	0.306 (18)
S. lemnae	0.713	---	0.379 (18)	0.112 (20)	0.208 (17)	0.278 (18)
S. pustulata	1.438	0.969	---	0.201 (18)	0.286 (17)	0.191 (18)
S. spec.	1.969	2.186	1.602	---	0.206 (17)	0.042 (18)
S. pusilla	2.010	1.569	1.253	1.580	---	0.290 (17)
O. fallax	1.183	1.280	1.658	3.160	1.237	---

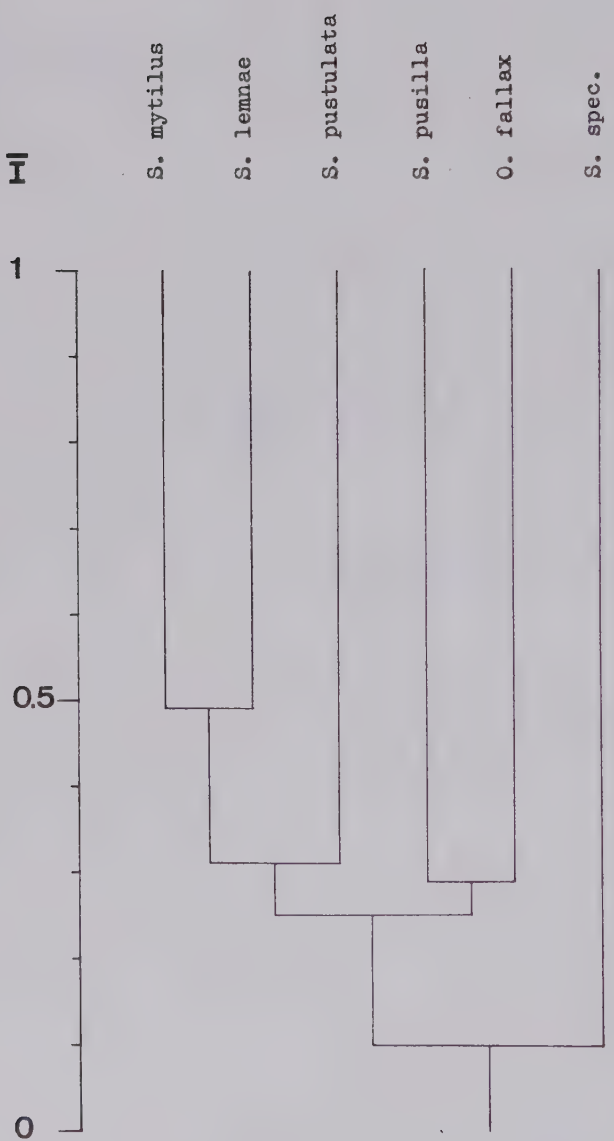


Abb. 29 Dendrogramm der untersuchten Arten der Familie Oxytrichidae, konstruiert mit den Daten von Tabelle 8

Tab. 9 Genetische Identität ($\overline{I}$, oberhalb Diagonale) und genetische Distanz ($\overline{D}$, unterhalb Diagonale) zwischen sechs Arten der Familie Oxytrichidae, berechnet nach den Allelfrequenzen von 15 ausgewählten Loci ($\overline{I}$ der einzelnen Loci 0.1)

	S. mytilus	S. lemnae	S. pustulata	S. spec.	S. pusilla	O. fallax
S. mytilus	---	0.543	0.261	0.173	0.198	0.387
S. lemnae	0.610	---	0.448	0.152	0.285	0.358
S. pustulata	1.344	0.802	---	0.278	0.372	0.274
S. spec.	1.753	1.885	1.281	---	0.270	0.098
S. pusilla	1.619	1.255	0.989	1.310	---	0.306
O. fallax	0.949	1.027	1.294	2.322	1.184	---

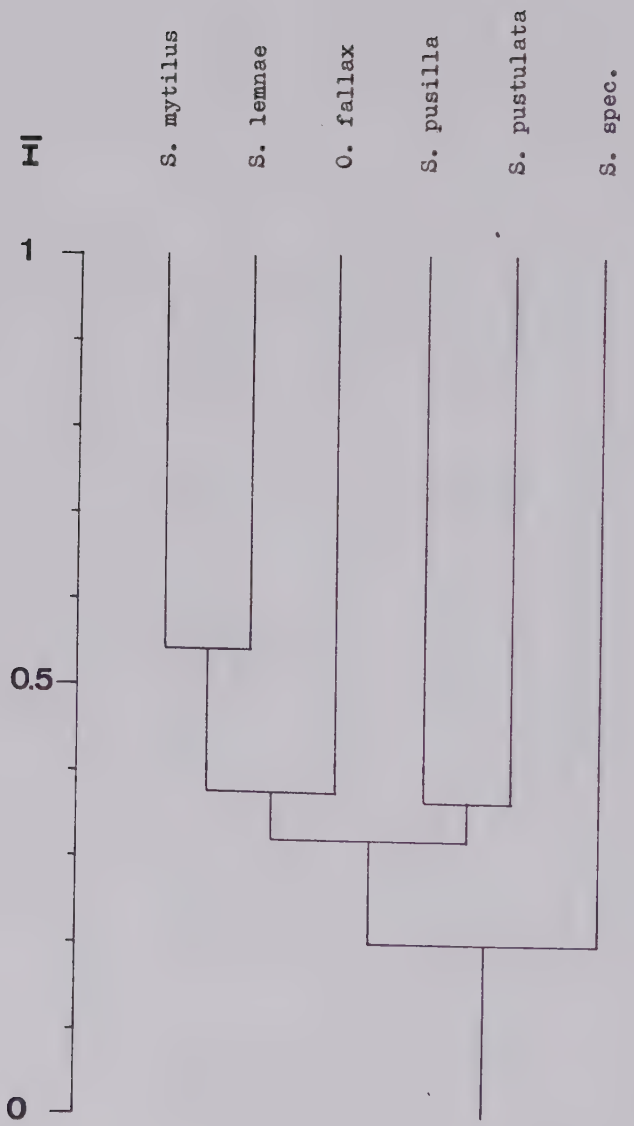


Abb. 30 Dendrogramm der untersuchten Arten der Familie Oxytrichidae, konstruiert mit den Daten von Tabelle 9

3.2.4.2. Geographische Differenzierung

Da von S. mytilus einige Stämme aus China und ein Stamm aus Indien untersucht werden konnten, wurden diese, auf der Basis von 18 Enzymen, mit den deutschen Klonen verglichen. In der Wanderungsstrecke der Amylase unterschieden sich die asiatischen Klone von den deutschen. Der indische Stamm unterscheidet sich von allen anderen zusätzlich durch das Pept IV_{105}- und Pgm III_{96}- Allel. Es wurden für diese drei geographischen Gruppen ebenfalls die Identitäts- und Distanzwerte ausgerechnet:

	Deutschland	China	Indien
Deutschland	---	0.864	0.758
China	0.146	---	0.722
Indien	0.277	0.325	---

Ein Dendrogramm für die Vertreter von drei geographischen Bereichen ist in Abb. 31 gegeben. Die Identitätswerte liegen im Bereich, der in der Literatur (Ayala, 1975) für Unterarten angegeben wird.

3.2.4.3. Genetische Identität in der Gattung Euplotes

Von der Gattung Euplotes standen fünf Arten, allerdings jeweils nur ein Stamm, zur Verfügung. Es konnten in dieser Familie nicht so viele Enzyme dargestellt werden wie bei den Oxytrichidae. Auf der Basis von 11 Enzymen wurden die mittlere genetische Identität und Distanz ausgerechnet (Tab. 10) und ein Dendrogramm erstellt (Abb. 37). Dabei fällt die hohe durchschnittliche Identität zwischen den vier Süßwasserarten auf. Besonders deutlich wird dies bei E. plumipes und E. eurystomus, deren $\bar{I}$ - Wert dem zwischen Populationen einer Art (Ayala, 1975) entspricht. Allenfalls der $\bar{I}$ - Wert zwischen E. aediculatus und den anderen Arten liegt noch im Bereich, der für Geschwisterarten charakteristisch ist (Ayala, 1975). Im Gegensatz hierzu steht die Tatsache, daß sich die marine Art E. crassus von den Süßwasserarten in allen untersuchten Enzymen unterscheidet ($\bar{I}$ = 0.0).

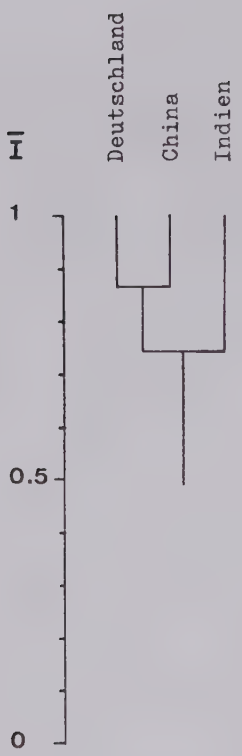


Abb. 31 Dendrogramm der untersuchten Stämme von S. mytilus aus drei verschiedenen Ländern

Tab. 10 Genetische Identität ($\overline{I}$) und genetische Distanz ($\overline{D}$) zwischen fünf Arten der Gattung Euplotes, berechnet nach den Allelfrequenzen von 11 Loci

	E. aediculatus	E. eurystomus	E. plumipes	E. woodruffi	E. crassus
E. aediculatus	---	0.558	0.651	0.620	0
E. eurystomus	0.583	---	0.909	0.787	0
E. plumipes	0.429	0.095	---	0.696	0
E. woodruffi	0.478	0.239	0.362	---	0
E. crassus	∞	∞	∞	∞	---

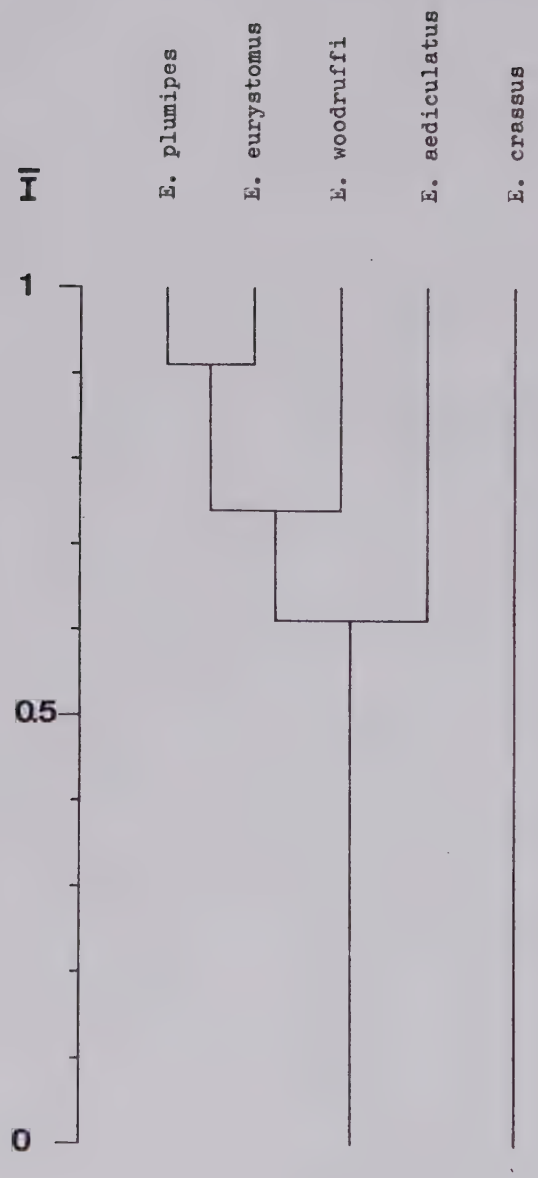


Abb. 32 Dendrogramm der untersuchten Euplotes - Arten, konstruiert mit den Daten von Tabelle 10

3.2.4.4. Genetische Identität der beiden unbestimmten Klone Styx I und Styx II, Vergleich mit Vertretern der Oxytrichidae und Urostylidae

Die beiden Klone Styx I und Styx II, zeigen, basierend auf dem Vergleich von 15 Enzymen, eine hohe genetische Identität: $\bar{I}$ = 0.745, $\bar{D}$ = 0.294. Diese Werte liegen im Bereich von Unterarten (Ayala, 1975). Zur Klärung der systematischen Stellung dieser beiden Klone wurde, aufgrund der morphologischen Hinweise (Kap. 3.1.2.) ein Vergleich mit P. weissei (Urostylidae) durchgeführt. Hierbei ergibt sich ein Durchschnittswert von $\bar{I}$ = 0.144. Beim Vergleich der unbekannten Klone mit den Vertretern der Oxytrichidae ergibt sich ein ähnlicher Wert von $\bar{I}$ = 0.127, so daß, aufgrund der Enzymdaten, diese Klone keiner der beiden Familien zugeordnet werden können.

Demgegenüber zeigt sich ein etwas höherer durchschnittlicher Identitätswert von P. weissei zu den Oxytrichidae: $\bar{I}$ = 0.169. Besonders auffallend ist der hohe $\bar{I}$ - Wert zwischen P. weissei und S. pusilla von 0.422. Allerdings können diese $\bar{I}$ - Werte nicht mit denen in Tab. 8 und 9 gleichgesetzt werden, weil in diesen mehr Loci verglichen wurden. Dennoch bleibt die hohe genet. Identität zwischen diesen beiden Arten (vier Enzyme zeigen gleiche Bandenpositionen) auffällig.

4. Diskussion

4.1. Vergleich der beiden Geschwisterarten S. mytilus und S. lemnae.

Diese beiden Arten wurden im Zusammenhang mit der Neubeschreibung von S. lemnae (Ammermann und Schlegel, 1983) auf drei molekularen Ebenen verglichen (Steinbrück und Schlegel, 1983): Anhand der mit Restriktionsenzymen verdauten Mikronucleus - DNS (50 % repetitive Sequenzen), der Makronucleus - DNS (hauptsächlich Strukturgene) und der Enzymmuster von 8 Enzymen (10 Loci), jeweils nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

Alle drei Methoden erwiesen sich als zuverlässige Kriterien zur Unterscheidung der beiden Arten, wobei das Bandenmuster der Mikronucleus - DNS die größte intraspezifische Variabilität zeigte. Der Vergleich von 10 Enzym - Loci ergab einen Wert von $\overline{I}$ = 0.628. Dieser Wert liegt im Bereich, der in der Literatur für Geschwisterarten angegeben wird (Ayala, 1975). Bis zum Abschluß dieser Arbeit konnten mehr Enzym - Loci (23) und erheblich mehr Stämme getestet werden (Tab. 5). Dabei ergibt sich ein $\overline{I}$ - Wert von 0.490. Dieser niedrigere Wert ist dadurch bedingt, daß sich unter den zusätzlich getesteten Enzymen auch solche mit geringer Substratspezifität befinden (z. B. Peptidasen), die im Allgemeinen variabler sind als Enzyme des Glucose-Metabolismus (Kojima et. al., 1970). Zusätzlich konnten in einem Fall (Saure Phosphatase) durch die Umstellung auf ein anderes Puffersystem (Tris-Citrat, pH 7.8, vorher Tris-Citrat, pH 8.6/Borat-NaOH, pH 8.1) die Enzyme der beiden Arten unterschieden werden.

Diese Werte liegen aber durchaus noch im Bereich, der für andere Geschwisterarten angegeben wird (Allen et. al., 1983; Borden et. al. 1977). In Tabelle 11 sind die $\overline{I}$ - Werte verschiedener Geschwisterarten und verschiedener morphologisch unterscheidbarer Arten aufgeführt, wobei für manche Gattungen die Werte von Geschwister- und morphologisch unterscheidbaren Arten angegeben sind (z. B. Drosophila, Willistoni Gruppe). Über die Problematik der veränderten $\overline{I}$ - Werte wird in Kap. 4.4. näher eingegangen.

Tabelle 11 Genetische Identität ($\overline{I}$) und genetische Distanz ($\overline{D}$) zwischen Arten in verschiedenen Tiergruppen

	$\overline{I}$	$\overline{D}$	Zahl der vergl. Loci
Geschwisterarten			
Paramecium aurelia, 14 Geschwisterarten (Allen et. al., 1983)	0.438	0.825	11
Tetrahymena pyriformis 12 Geschwisterarten (Borden et. al., 1977)	0.670	0.400	10 - 12
Stylonychia, 2 Geschwisterarten (vorl. Arbeit)	0.490	0.713	23
Drosophila, Willistoni-Gruppe (Ayala, 1975)	0.563	0.581	36
morphologisch unterscheidbare Arten			
Stylonychia	0.294	1.224	15
Drosophila, Willistoni-Gruppe (Ayala, 1975)	0.352	1.057	36
Taricha (Salamander) (Ayala, 1975)	0.745	0.296	42
Anolis (Eidechsen) (Ayala, 1975)	0.667	0.405	23

4.1.1. Intraspezifischer Enzympolymorphismus

Da für S. mytilus und S. lemnae eine größere Zahl von Klonen getestet wurde, ist für diese Arten eine Schätzung der innerartlichen Variabilität (= intraspezifischer Polymorphismus) sinnvoll. Als ein Maß hierfür können die Frequenzen des häufigsten Allels der untersuchten Loci oder der durchschnittlich erwartete Heterozygotiegrad verwendet werden (Tab. 7).

Daraus ergibt sich im Vergleich zu früheren Befunden (Steinbrück und Schlegel) eine erhöhte innerartliche Variabilität. Der durchschnittliche errechnete Heterozygotiegrad ist mit 0.2 (= 20 %) besonders hoch (errechnete Heterozygotenhäufigkeiten bei Pflanzen: 4.6 %, Wirbellosen: 13.4 %, Wirbeltieren: 6 %, Mensch: 6.7 %; Ayala, 1982).

Bei hohem intraspezifischem Polymorphismus wird die Wahrscheinlichkeit größer, daß beim Vergleich verschiedener Arten Enzyme, die sich in der As - Sequenz unterscheiden, zur selben Position im Gel wandern und so eine Ähnlichkeit vortäuschen. Ist z. B. beim Vergleich verschiedener Arten die Distanz zwischen langsamstem und schnellstem Enzym 2 cm und sind die einzelnen Banden 2 mm dick, so können maximal 10 Positionen unterschieden werden. Die Chance, daß zwei verschiedene Enzyme zufällig die gleiche Position einnehmen ist 1 : 10 = 0.1.

Da diese "Zufallsidentitäten" beim Vergleich von mehreren Arten zwischen jedem Artenpaar mit der gleichen Wahrscheinlichkeit auftreten, werden dadurch die Verwandtschaftsverhältnisse in der Regel nicht verfälscht wiedergegeben. Dennoch sollten hochpolymorphe Loci für Untersuchungen über Verwandtschaftsverhältnisse vermieden werden, da hier die Gefahr der zufälligen Identität erhöht ist. Bei den vorliegenden Untersuchungen erscheint jedoch auch bei den hochpolymorphen Loci in der Regel ein Allel mit hoher Frequenz mit Werten um 0.8 (Tab. 7).

Heterozygotie

Bei beiden Arten ist die gefundene Heterozygotenhäufigkeit geringer als die erwartete. Bei gleichem erwartetem Heterozygotiegrad ist jedoch bei S. mytilus die gefundene Heterozygotenhäufigkeit 2.5 mal geringer als bei S. lemnae (Tab. 7). In der Kultur kann beobachtet werden, daß Stämme

von S. mytilus viel häufiger intraklonal konjugieren, als Stämme von S. lemnae. Dies führt wahrscheinlich zu weitgehend homozygoten Stämmen und erklärt den geringen Heterozygotiegrad in den getesteten Stämmen von S. mytilus. Ob in der Natur ebenfalls Teilungsgeschwister häufig miteinander konjugieren, kann aus dieser Beobachtung nicht mit Sicherheit geschlossen werden, da die untersuchten Klone z. T. schon lange (bis zu drei Jahren) im Labor gehalten wurden. Um diese Frage zu klären, ist es notwendig, isolierte Klone so schnell wie möglich zu testen, damit intraklonale Konjugation vermieden wird.

Pringle (1956) hat in einer ausführlichen Untersuchung über die Antigenvariation bei Paramecium aurelia, Varietät 9, ebenfalls eine erhebliche Abweichung der beobachteten von der erwarteten Heterozygotenhäufigkeit gefunden. Die geringe Heterozygotenhäufigkeit wird bei P. aurelia auf das Vorkommen von Autogamie zurückgeführt (Pringle, 1956, Sonneborn, 1957), wodurch ebenfalls homozygote Individuen entstehen. Bei dieser Untersuchung wurden über 15 Monate hinweg aus einem größeren See alle 20 Tage bis zu 50 Wasserproben entnommen. Von jeder Probe wurde nur ein Klon angelegt. Dadurch wurde die Möglichkeit verringert, daß Nachkommen von Teilungsgeschwistern für verschiedene Klone gehalten werden, obwohl sie in Wirklichkeit auf eine Zelle zurückgehen und die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß die untersuchten Klone auf unterschiedliche Vorfahren zurückgehen und der beobachtete niedrige Heterozygotiegrad den Gegebenheiten in der Natur entspricht und kein Laboreffekt ist.

4.1.2. Geographische Differenzierung

Bei S. mytilus tritt ein Alloenzym auf, das bis jetzt nur bei den asiatischen Klonen gefunden wurde (Amy_{97}). Der indische Stamm unterscheidet sich durch zwei weitere Allozyme (Pept IV_{105} und Pgm III_{96}) von allen anderen S. mytilus - Klonen. Die Positionen anderer Enzyme dieser Stämme, sowie durchgeführte Kreuzungsexperimente (Ammermann und Schlegel, 1983) ergeben eindeutig, daß sie zu der Art S. mytilus gehören. Es müssen sicher mehr Stämme aus China und Indien mit anderen verglichen werden, um zu erfahren, ob tatsächlich andere Allele für dortige Populationen charakteristisch sind, oder ob es einen Poly-

morphismus für jeweils beide Allele in allen Populationen gibt, der aufgrund der Stichprobengröße bis jetzt nicht aufgedeckt werden konnte.

Die auf den vorliegenden Informationen errechneten $\bar{I}$ - Werte liegen jedoch im Bereich der für Unterarten angegeben wird (Ayala, 1975, 1982). Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen an den chinesischen Klonen, die aufgrund eines konstanten Größenunterschieds zu den anderen Klonen von S. mytilus (270 $\pm$ 23 µm gegenüber 300 $\pm$ 22 µm bei S. mytilus) als Rasse dieser Art bezeichnet wurden (Ammermann und Schlegel, 1983).

4.2. Genetische Identität zwischen Arten der Gattung Stylonychia und O. fallax, Vergleich mit den morphologischen Ergebnissen

Im Gegensatz zu den morphologischen Merkmalen zeigen die Enzymmuster beträchtliche Unterschiede zwischen den untersuchten Arten, die zu ihrer Bestimmung herangezogen werden können. Es wird deshalb ein Bestimmungsschlüssel für diese Arten angefertigt (s. Anhang). In diesem Zusammenhang ist es besonders auffällig, daß S. spec., die morphologisch der Art S. mytilus sehr ähnlich sieht, zu ihr den geringsten Identitätswert von allen untersuchten Arten aufweist.

Hohe genetische Divergenz trotz morphologischer Ähnlichkeit wird bei vielen Organismen beschrieben, z. B. Lycopodium lucidulum[1)] (Levin and Crepel, 1973), Limulus polyphemus[1)] (Selander et. al., 1970) verschiedene Geschwisterarten von Drosophila (Ayala, 1975) Thyonella gemmata, zwei Geschwisterarten (Manwell und Baker, 1963). Dabei fällt auf, daß Arten, die sich im Lauf der Evolution morphologisch wenig verändert haben, oft ein erhebliches Maß an molekularen Unterschieden zeigen. Nach Kimura (1968) haben Proteine konstante Evolutionsraten und können deshalb als "molekulare Uhr" für phylogenetische Studien verwendet werden. Der umgekehrte Fall, hohe morphologische Divergenz trotz großer Ähnlichkeit im Bau der Makromoleküle, tritt z. B. bei Säugetieren auf, die in relativ kurzer Zeit eine große Vielfalt an morphologisch unterscheidbaren Arten entwickelt haben (Dickerson u. Geis, 1983; Goodman et. al., 1983; Nanney, 1980).

[1)] hier besteht eine große morphologische Ähnlichkeit zu den gefundenen Fossilien

Dabei wird angenommen, daß Differenzierungsvorgänge bei Eukaryonten über Regulatorgene gesteuert werden und morphologische Veränderungen wohl eher durch die Evolution von Regulatorgenen und veränderte Genexpressionsmuster bedingt sind (King u. Wilson, 1975; Wilson, 1976). Somit müssen die Evolution von Strukturgenen und morphologische Adaptation nicht korreliert sein.

Auf zwei verschiedenen Grundlagen wurden mit den Enzymdaten Dendrogramme konstruiert. Einmal wurden alle Loci, die zwischen zwei Arten verglichen werden konnten, in die Berechnungen eingeschlossen. Im zweiten Fall wurden nur solche Loci eingerechnet, deren durchschnittliche Identität größer als 0.1 war (Tab. 7). Bei beiden Dendrogrammen steht Oxytricha fallax innerhalb der Gattung Stylonychia und nicht außerhalb. Dieses Ergebnis deckt sich mit den morphologischen Untersuchungen. Damit verstärken sich die Zweifel, ob es wirklich sinnvoll ist, zwei Gattungen, Oxytricha und Stylonychia, aufzustellen. Hemberger (1982) weist in seiner Dissertation darauf hin, daß er bei keiner Oxytricha - Art, die er untersucht hat, durchlaufende Marginalcirren feststellen konnte (Hemberger, 1982, S. 6 u. S. 127). Er nimmt an, daß von früheren Autoren sehr weit terminal stehende Caudalcirren als Marginalcirren gedeutet wurden. In diesem Zusammenhang weist er auch darauf hin, daß die Caudalcirren nicht umgebildete Marginalcirren sind, wie Kahl (1932) annimmt, sondern dorsal, am Ende einer Dorsalcilienreihe entstehen. Dies wird auch auf den in dieser Arbeit abgebildeten Dorsalaufnahmen der verschiedenen Stylonychia - Arten deutlich (Abb. 6, 8, 10).

Für die Systematik hat dies erhebliche Konsequenzen. Mit dem Wegfallen der Unterscheidungsmöglichkeiten (Marginalcirrenreihe geschlossen - nicht geschlossen) muß nach anderen Kriterien gesucht werden, oder die Gattungen müssen unter dem älteren Gattungsnamen zusammengefaßt werden. Bevor jedoch endgültige Schlüsse gezogen werden, müssen unbedingt mehr Arten, die der Gattung Oxytricha zugeordnet werden, morphologisch und biochemisch verglichen werden.
Die beiden Dendrogramme unterscheiden sich in den Positionen von O. fallax und S. pustulata. In den beiden, den Dendrogrammen zugrunde liegenden Identitäts - Matrices (Tab. 8 und 9) haben diese beiden Arten und die Art S. pusilla ähnliche Identitätswerte, so

daß es hier durch den veränderten Ansatz leicht zu einer Umstellung kommen kann. Insgesamt sind die Identitätswerte bei dem Vergleich von 15 Loci etwas höher, weil hier nur solche Loci verwendet wurden, deren $\overline{I}$ - Wert größer 0.1 war.

Es besteht jedoch der Eindruck, daß $\overline{I}$ - Werte zwischen den verglichenen Arten von der Zahl der berücksichtigten Loci abhängen könnte. Deshalb ist es wichtig, die Werte in dieser Arbeit im Verhältnis der untersuchten Arten zueinander und nicht als Absolutwerte zu betrachten. In Kapitel 4.4 soll auf dieses Problem noch näher eingegangen werden.

4.3. Genetische Identität in der Gattung Euplotes

Hier sind die $\overline{I}$ - Werte zwischen den Süßwasserarten sehr hoch, während zu der marinen Art E. crassus bis jetzt kein identisches Enzymprotein nachgewiesen werden konnte. Durch den Umstand, daß von jeder Art nur ein Stamm getestet werden konnte, sind diese Ergebnisse jedoch mit Vorsicht zu interpretieren.

Nei (1978) und Gorman und Renzi (1981) kommen aufgrund theoretischer Überlegungen und empirischer Vergleiche zu der Überzeugung, daß Identitäts- und Distanzwert - Schätzungen durch den Vergleich von ein bis wenigen Stämmen (Individuen) weniger beeinträchtigt werden,als durch die Zahl der untersuchten Loci, solange die genetische Distanz genügend hoch ($\overline{D} > 0.15$) und der Heterozygotiegrad klein genug ($\overline{H} < 0.05$) ist.

Mit Ausnahme des Distanzwertes von E. plumipes und E. eurystomus ($\overline{D}$ = 0.095) liegen die $\overline{D}$ - Werte der untersuchten Euplotes - Arten deutlich über diesen Grenzwerten. Der $\overline{H}$ - Wert ist für die verglichenen Stämme, mit Ausnahme von E. aediculatus ($\overline{H}$ = 0.09) null. Dadurch kann dem hier dargestellten Vergleich doch einige Aussagekraft zugesprochen werden.

Die untersuchten Süßwasser-Arten gehören alle zu einer nahe verwandten Gruppe mit demselben Cirrentypus ("9 type 1") und omikronähnlichen Endosymbionten (Heckmann, 1983). Der Artstatus von E. plumipes, die zu E. eurystomus eine sehr hohe Identität aufweist (0.9), ist in der Literatur umstritten. Curds (1975) lehnt E. plumipes als eigene Art ab. Heckmann et. al. (1983) stimmen mit Curds nicht überein. Sie berichten

E. plumipes sei morphologisch E. aediculatus ähnlicher als E. eurystomus, konjugiere jedoch mit keiner von beiden. Auch sind nach ihren Angaben die Endosymbionten von E. plumipes auf E. eurystomus nicht übertragbar, was sonst innerhalb von Arten möglich ist. Zumindest sind die Ergebnisse der Enzymelektrophorese ein Hinweis dafür, daß diese beiden Arten noch sehr nahe miteinander verwandt sind und sich wahrscheinlich erst vor relativ kurzer Zeit getrennt haben. Innerhalb der Gruppe müssen mehr Stämme und mehr Arten miteinander verglichen werden, um zu erfahren, ob innerhalb der Süßwasserarten eine so hohe genetische Identität vorliegt und ob andere marine Arten sich genauso von diesen unterscheiden. Sollte dies der Fall sein, wäre, zumindest aufgrund der Enzymdaten, die Gattung Euplotes nicht mehr haltbar und sollte in zwei Gattungen getrennt werden.

4.4 Probleme und Grenzen der Methode

Zwei Tatsachen lassen Bedenken an der Zuverlässigkeit der enzymelektrophoretischen Untersuchungen und ihrer genetischen Interpretation mit Hilfe des Nei'schen Identitätskoeffizienten aufkommen:

Erstens steht der hohe $\bar{I}$ - Wert zwischen S. pusilla und P. weissei im Gegensatz zu den anderen hier vorgelegten Ergebnissen und zu den morphologischen und genetischen Unterschieden.

Zweitens entsteht bei der Stylonychia - Gruppe der Eindruck, daß mit zunehmender Zahl der verglichenen Loci die $\bar{I}$ - Werte kleiner werden.

Die erste dieser Beobachtungen zeigt, daß bei alleiniger Anwendung der Methode Irrtümer bei der Einordnung einer Art entstehen können und fordern, soweit möglich, den Vergleich mit anderen, z. B. morphologischen Kriterien. Gleichzeitig scheint, zumindest bei Ciliaten, die sinnvolle Anwendung der Enzymelektrophorese und ihre Auswertung mit den Nei'schen Koeffizienten auf der Gattungsebene ihre Grenzen zu finden.

Der hohe $\bar{I}$ - Wert zwischen P. weissei und S. pusilla entsteht möglicherweise aufgrund der geringen Zahl an untersuchten Loci und einer zum Teil zufälligen Übereinstimmung in der Mobilität einiger Enzyme.

Um höhere Taxa sinnvoll miteinander zu vergleichen, bieten sich Strukturproteine an, die im Allgemeinen konservativer sind als Enzymproteine (Jones, 1980). Eine Möglichkeit bestünde vielleicht auch im Vergleich der Endsequenzen der kurzen, etwa gen-großen DNS - Moleküle (sogenannte "inverted terminal repeats") des Makronukleus (Klobutcher et. al., 1981). Dadurch könnte vielleicht eine Zuordnung der beiden Stämme Styx I und II zu einer der beiden Familien (Oxytrichidae, Urostylidae) gelingen.

Die zweite Beobachtung zeigt, daß offensichtlich nicht jeder Locus gleich tauglich ist für den Vergleich von Arten. Die Schätzung der genetischen Identität anhand von Enzymdaten basiert auf der Annahme, daß (zumindest im Durchschnitt) Enzyme mit gleicher Mobilität in ihrer Aminosäuresequenz (und damit in den betreffenden Strukturgenen) ähnlicher sind als solche mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit. Diese Annahme wird durch folgende Möglichkeiten eingeschränkt:

Zeigt ein Locus beim Vergleich zwischen den untersuchten Arten eine niedrige durchschnittliche Identität ($\bar{I} < 0.1$), wird, aufgrund der limitierten Zahl der unterscheidbaren Positionen im Gel, die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß dieser Wert zufällig und nicht aufgrund einer ähnlicheren Aminosäuresequenz zustande kommt. Diese Möglichkeit wird noch größer, wenn Loci mit hoher intraspezifischer Variabilität verglichen werden (s. Kap. 4.1.1 Intraspezifischer Enzympolymorphismus).

Beim Vergleich von Arten anhand von Enzymdaten sollten daher folgende Kriterien berücksichtigt werden:

1. Es sollten so viele Loci wie möglich verglichen werden.
2. Die verglichenen Loci sollten einen geringen innerartlichen Polymorphismus aufweisen.
3. Ihre zwischenartliche Variabilität sollte aber auch nicht zu groß ($\bar{I}$ über alle verwendeten Arten der Gruppe nicht kleiner als 0.1) sein.

4.5 Phylogenetische Aspekte

Die in dieser Arbeit vorgelegten Dendrogramme geben nur bedingt die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse wieder:

Es müßte angenommen werden, daß homologe Proteine konstante Substitutionsraten aufweisen. Dies ist für den relativ kurzen Zeitraum seit der Divergenz von Arten einer Gattung vermutlich nicht der Fall. Es muß jedoch erwähnt werden, daß bei anderen Methoden der Konstruktion von Dendrogrammen (Fitch und Margoliash, 1967; Farris, 1972) keine konstanten Evolutionsraten angenommen werden.

Weiterhin werden mögliche Konvergenzen in der Evolution nicht berücksichtigt.

Außerdem wird nicht in ursprüngliche und abgeleitete Merkmale unterschieden. Só kann z. B. eine hohe genetische Identität zwischen zwei Arten durchaus ein plesiomorpher Zustand sein, der über die phylogenetischen Zusammenhänge nichts aussagt (Hennig, 1982).

Patton et. al. (1981) haben Enzymdaten von Nagern der Familie Cricetidae phenetisch (mit Hilfe der UPGMA - Methode) und cladistisch (mit Hilfe der Hennig'schen Methode) ausgewertet. Diese Ergebnisse wurden mit einem Stammbaum, der nicht mit Enzymdaten erstellt wurde, verglichen. Leider wird nicht erwähnt, auf welcher Basis dieser Vergleichsstammbaum erstellt wurde. Dabei ergibt das Cladogramm eine etwas bessere Übereinstimmung mit dem herkömmlichen Stammbaum als das phenetische Dendrogramm. Ayala et. al. (1974) haben andererseits eine deutliche Korrelation zwischen genetischer Distanz und dem jeweiligen Niveau der untersuchten Taxa von Drosophila gefunden.

So ist meines Erachtens, trotz der dargelegten Einwände, die phenetische Methode, basierend auf dem Vergleich von Enzymdaten, nicht abzulehnen, zumal die hier vorgelegten Ergebnisse in Einklang mit den bekannten morphologischen Befunden stehen (fraglicher Artstatus von E. plumipes; Subspezies von S. mytilus; Frage der Gattungsunterscheidung Oxytricha - Stylonychia).

Diese Methode hat den Vorteil der präziseren Aussage über aktuelle genetische Verwandtschaftsverhältnisse, während die Hennig'sche Methode die genealogischen Zusammenhänge wohl besser wiedergibt.

Für die Stylonychia - Gruppe können neun der untersuchten Enzyme nach der Hennig'schen Methode (Hennig, 1982) interpretiert werden. Dabei wird angenommen, daß Bandenpositionen, die auch von P. weissei bzw. Styx eingenommen werden, den ursprünglichen (plesiomorphen) Zustand anzeigen. Davon abweichende Banden in der Stylonychia - Gruppe werden als abgeleitet (apomorph) gewertet ("out - group" - Vergleich, Patton, 1981), wobei für die Rekonstruktion der Phylogenese nur gemeinsame abgeleitete Merkmale (Synapomorphien) für die Zusammenfassung von Arten zu Gruppen verwendet werden (Hennig, 1966, 1982).

Bei dem Versuch, ein Cladogramm zu erstellen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Jedes der lesbaren Merkmale wurde an die Basis eines Cladogramms gestellt und anschließend anhand der gemeinsamen abgeleiteten Merkmale versucht, die Arten in Gruppen zusammenzufassen. Dabei ergibt sich unter Einbeziehung von S. spec kein Cladogramm, weil sich zu viele der abgeleiteten Merkmale widersprechen. Für die übrigen fünf Arten ergibt sich, ebenfalls bei der Durchkalkulation aller Möglichkeiten, ein Cladogramm, das mit drei Befunden im Widerspruch steht (Est. I, Pept. IV und Alat II, Abb. 33). Alle anderen Möglichkeiten bergen mehr Widersprüche in sich. Dieses Cladogramm gibt daher, bei Berücksichtigung der momentan verfügbaren Information, die genealogischen Verwandtschaftsverhältnisse am besten wieder. Außerdem deckt es sich, bis auf die Tatsache, daß S. spec. nicht mit in das Cladogramm einbezogen werden konnte, mit dem Dendrogramm, das auf der Basis von 15 Enzymloci erstellt wurde.

Es muß jedoch an dieser Stelle erwähnt werden, daß mit Enzymdaten bis jetzt keine phylogenetischen Reihen aufgestellt werden konnten und somit die Lesrichtung von ursprünglich zu abgeleitet unsicher ist. Im Gegensatz hierzu lassen sich bei Sequenzdaten von Nucleinsäuren oder Aminosäuren phylogenetische Reihen aufstellen (z. B. Goodman, et. al., 1983). Deshalb erscheinen Sequenzdaten für phylogenetische Untersuchungen mit der Hennig'schen Methode geeigneter als elektrophoretische Enzymdaten.

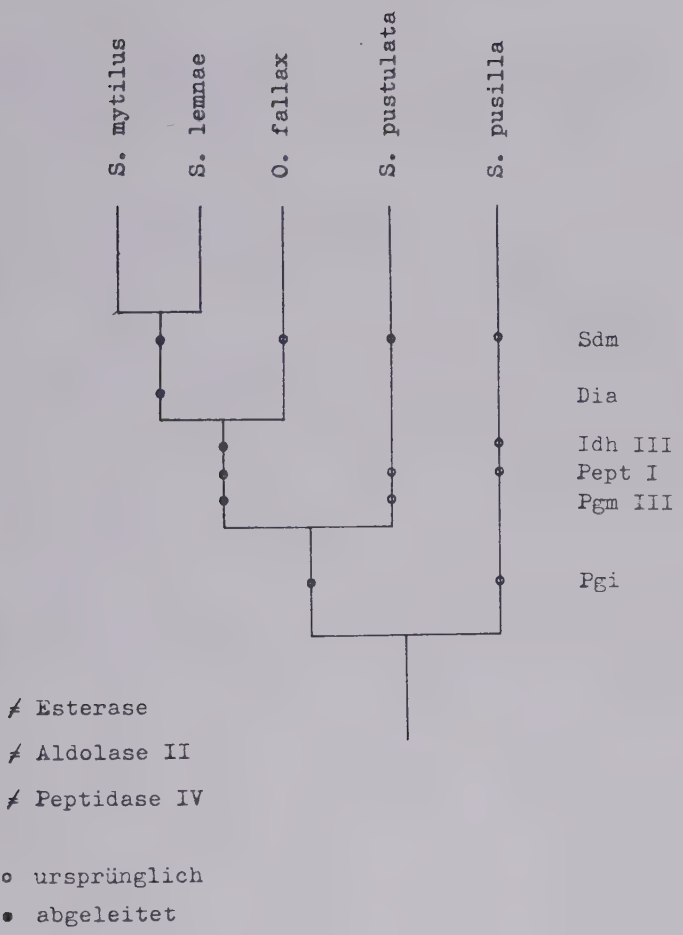


Abb. 33 Cladogramm von fünf Arten der Stylonychia - Gruppe

Anhang

Enzyme, die eine geringe innerartliche Variabilität und eine geringe zwischenartliche Identität zeigen, eignen sich gut zu taxonomischen Zwecken.

Bei den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, daß die Enzyme GPT II, Mdh, ME, Tdh, Pept. I und IV und Sdm diese Bedingungen annähernd erfüllen. Mit Hilfe der Bandenpositionen dieser Enzyme lassen sich die Arten der Stylonychia - Gruppe bestimmen.

Im Prinzip ließen sich die Arten schon anhand der Malatdehydrogenase erkennen, weil diese bei jeder der hier berücksichtigten Arten eine andere Bandenposition einnimmt (Abb. 23). Dieses Enzym zeigt aber eine geringe Mobilität und die Unterschiede sind dadurch nicht immer deutlich erkennbar. Es wurde deshalb mit anderen Enzymen ein Bestimmungsschlüssel erstellt und die Mdh - Positionen in Klammer bei der betreffenden Art mit angegeben. Der Schlüssel basiert auf dem Vergleich mit S. mytilus (= 100) als Referenzprobe. Dabei wurde, um Bestimmungen möglichst schnell und mit wenig Arbeitsaufwand durchzuführen, darauf geachtet, daß Enzyme verwendet werden, die alle nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Gel dargestellt werden können.

Bestimmungsschlüssel für die Arten der Stylonychia - Gruppe

1	(6)	Idh III Position 100	2
2	(5)	Idh I Pos. 14	3
3	(4)	Sdm Pos. 100	S. lemnae (Mdh Pos. 200)
4		Sdm Pos. 75	O. fallax (Mdh Pos. + 20)
5		Idh I Pos. 22	S. spec. (Mdh Pos. 50)
6	(7)	Idh III Pos. 105	S. pustulata (Mdh Pos. 140)
7		Idh III Pos. 95	8
8	(9)	Sdm Pos. 90	S. spec.
9		Sdm Pos. 75	10
10	(11)	Idh I Pos. 22	S. pusilla (Mdh Pos. -20)
11		Idh I Pos. 14	O. fallax

6. Zusammenfassung

Zwölf hypotriche Ciliaten aus drei verschiedenen Familien (Oxytrichidae, 6 Arten; Urostylidae, 1 Art u. Euplotidae, 5 Arten) wurden mit Hilfe der Enzymelektrophorese untersucht. Bei den Oxytrichidae sowie bei zwei unbestimmten Klonen wurden zusätzlich zu den biochemischen auch morphologische Untersuchungen durchgeführt.

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt:

Oxytrichidae:

Es wurden fünf Arten der Gattung Stylonychia und ein Vertreter der Gattung Oxytricha morphologisch und biochemisch verglichen. Die morphologischen Unterschiede sind gering. Das für die Gattung Oxytricha als charakteristisch angegebene Merkmal (durchgehende Marginalcirren) trifft für die untersuchte Art nicht zu. Demgegenüber sind die Unterschiede in den Enzymmustern beträchtlich. Die untersuchten Arten lassen sich anhand dieser Unterschiede bestimmen, es wurde deshalb ein Bestimmungsschlüssel angefertigt.

Innerartlicher Polymorphismus

Bei den beiden Geschwisterarten Stylonychia mytilus und Stylonychia lemnae wurden 23 Enzym - Loci an einer größeren Zahl von Stämmen untersucht. Dabei wurde ein hoher intraspezifischer Polymorphismus festgestellt, wobei besonders eine hohe erwartete Häufigkeit der Heterozygoten auffällt, die aus der Zahl der beobachteten Allelfrequenzen errechnet wird. Bei gleicher erwarteter Heterozygotenhäufigkeit (ca. 20 %) ist bei S. mytilus die tatsächlich beobachtete Häufigkeit der Heterozygoten (3.9 %) 2.5 mal geringer als bei S. lemnae (9.6 %) Dies wird auf die, zumindest in der Kultur zu beobachtende, häufige intraklonale Konjugation bei S. mytilus zurückgeführt, wodurch wahrscheinlich weitgehend homozygote Stämme entstehen.

Geographische Differenzierung

Bei S. mytilus konnten einige asiatische Stämme mit den in Deutschland gesammelten verglichen werden. Mit Hilfe der Nei'schen Koeffizienten der mittleren genet. Identität ($\overline{I}$) und der mittleren genet. Distanz ($\overline{D}$) wurden die Stämme auf der Basis von 18 Enzym - Loci miteinander verglichen. Die Identitätswerte liegen im Bereich, der für Unterarten angegeben wird.

Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse

Ebenfalls mit Hilfe der Nei'schen Koeffizienten wurden die untersuchten Arten, auf der Basis von 15 Enzym - Loci, paarweise miteinander verglichen. Dabei ergab sich ein mittlerer $\overline{I}$ - Wert von 0.294. Kongruent zu den morphologischen Ergebnissen, zeigte die untersuchte Art Oxytricha fallax eine ähnliche Identität zu den Stylonychia - Arten, wie sie diese untereinander aufweisen. Die Identitätswerte wurden zur Erstellung eines phenetischen Dendrogramms mit Hilfe der UPGMA - Methode (Unweighted Pair Group Analysis by Means of Arithmetic) verwendet. Weiterhin wurde, auf der Basis von neun Enzymen, versucht, ein Cladogramm mit Hilfe der Hennig'schen Methode zu erstellen. Beide Methoden ergaben fast identische Ergebnisse. Vor- und Nachteile dieser beiden Ansätze (phenetisch und phylogenetisch) werden diskutiert.

Euplotidae

Auf der Basis von 11 Enzym - Loci wurden fünf Arten der Gattung Euplotes verglichen. Die vier Süßwasserarten zeigten dabei wesentlich höhere Identitätswerte, als sie für die Stylonychia - Gruppe charakteristisch sind ($\overline{I}$ = 0.704). Besonders der $\overline{I}$ - Wert zwischen E. eurystomus und E. plumipes ist sehr hoch und liegt im Bereich von Individuen verschiedener Populationen einer Art. Im Gegensatz hierzu unterscheidet sich die marine Art E. crassus von den Süßwasserarten in allen untersuchten Enzymen ($\overline{I}$ = 0.0).

Untersuchungen an den unbestimmten Klonen

Aufgrund der morphologischen Untersuchungen scheinen die beiden unbestimmten Klone Styx I und Styx II zu der Familie Urostylidae zu gehören (undifferenzierte Ventralcirren sind in mehreren Reihen angeordnet). Der Vergleich der Enzymmuster (15 Loci) ergab einen Identitätswert von 0.745, der in der Literatur für Unterarten angegeben wird. Aufgrund der Enzymmuster ließen sich diese Klone nicht in eine der beiden in Frage kommenden Familien (Oxytrichidae, Urostylidae) einordnen. Zu beiden sind die $\overline{I}$ - Werte gleich niedrig (ca. 0.14).

7. Literatur

Adams, J. P. u. Allen, S. L., 1975. Genetic Polymorphism and Differentiation in Paramecium. Isoenzymes IV, Genetics and Evolution. Markert, C. L. Ed. Academic Press, New York, 867 - 882.

Allen, S. L., Adams, J. u. Rushford, C. L., 1983. Interspecies Relationships in the Paramecium aurelia Complex: Acid Phophatase Variation. J. Protozool., 30, 143 - 147.

Ammermann, D., 1965. Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia mytilus Ehrenberg. Arch. Protistenk., 108, 109 - 152.

Ammermann, D., Steinbrück, G., Berger, L. von u. Hennig, W., 1974. The Development of the Macronucleus in the Ciliated Protozoan Stylonychia mytilus. Chromosoma, 45, 401 - 429.

Ammermann, D. u. Schlegel, M., 1983. Characterization of two Sibling Species of the Genus Stylonychia (Ciliata, Hypotricha): S. mytilus Ehrenberg 1838 and S. lemnae n. Sp. I. Morphology and Reproductive Behaviour. J. Protozool. , im Druck.

Andrews, A. T., 1981. Electrophoresis: thoery, techniques and biochemical and clinical applications. Monographs on Physical Biochemistry. Clarendon Press, Oxford.

Avise, J. C., Patton, J. C. u. Aquadro, C. F., 1980. Evolutionary Genetics of Birds. I. Relatioships Among North American Thrushes and Allies. The Auk, 97, 135 - 147.

Ayala, F. J., Tracey, M. L. Hedgecock, D. u. Richmond, C. R., 1974. Genetic Differentiation during the Speciation Process in Drosophila. Evolution, 28, 576 - 592.

Ayala, F. J., 1975. Genetic Differentiation During the Speciation Process. Ecolutionary Biology, Vol 8. Dobzhansky, T., Hecht, M. u. Steere, W. C., Ed. Plenum Press, New York.

Ayala, F. J., 1982. Population and Evolutionary Genetics. A Primer. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Menlo Park, Calif., USA.

Bahn, E., 1967. Crossing over in the Chromosomal Region Determining Amylase Isozymes in Drosophila melanogaster. Hereditas, 58, 1 - 12.

Baker, C. M. A., Manwell, C., Labisky, R. F. u. Harper, J. A., 1966. Molecular Genetics of Avian Proteins - V. Egg. Blood and Tissue Proteins of the Ring - necked Pheasant, Phasianus colchicus L. Comp. Biochem. Physiol., 17, 467 - 499.

Borden, D., Whitt, G. S. u. Nanney, D. L., 1973. Electrophoretic Characterization of Classical Tetrahymena pyriformis Strains. J. protozool., 20. 693 - 700.

Borden, D., Miller, E. T., Whitt, G. S. u. Nanney, D. L., 1977. Electrophoretic Analysis of Evolutionary Relationships in Tetrahymena. Evolution, 31, 91 - 102.

Borror, A. C. 1972. Revision of the Order Hypotrichida (Ciliophora, Protozoa). J. Protozool., 19, 1 - 23.

Borror, A. C., 1979. Redefinition of the Urostylidae (Ciliophora, Hypotrichida) on the Basis of Morphogenetic Characters. J. protozool., 26, 544 - 550.

Brewer, G. J., 1970. An Introduction to Isoenzyme Techniques. Academic Press, New York, London.

Bütschli, O., 1889. Infusoria und System der Radiolaria. Klassen und Ordnungen des Thier - Reichs. H. G. Bronn, Ed. C. F. Winter'scher Verlag, Leipzig, Heidelberg.

Corliss, J. O., 1979. The Ciliated Protozoa, Characterization, Classification and Guide to the Literature. 2. Aufl., Pergamon Press, Oxford, New York, Frankfurt.

Chapman - Andresen, C., 1958. Pinocytosis of Inorganic Salts by Amoeba proteus. C. R. Lab. Carlsberg, 31, 77 - 92.

Curds, C. R., 1975. A Guide to the Species of the Genus Euplotes (Hypotrichida, Ciliata). Bull. Br. Mus. (Nat. - Hist.) Zool., 28, 3 - 61.

Davis, B., 1964. Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 - 427.

Dickerson, R. E. u. Geis, I., 1983. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. The Benjamin/Cummings Publishing company Inc., Menlo Park, Calif., USA.

Doane, W., 1969. Amylase Variants in Drosophila melanogaster: Linkage Studies and Characterization of Enzyme Extracts. J. Exp. Zool., 171, 321 - 342.

Dragesco, J., 1966. Ciliés libres de Thonon et ses Environs. Protistologia, II, 2, 59 - 95.

Ehrenberg, C. G., 1838. Die Infusionsthiere als vollkommene Organismen. Leipzig.

Elliot, A. M. u. Hayes, R. E., 1953. Mating Types in Tetrahymena. Biol. Bull., 105, 269 - 284.

Enzyme Nomenclature, 1973. Recommendations (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry. Elsevier, Amsterdam.

Farris, J. S., 1972. Estimating Phylogenetic Trees from Distance Matrices. Amer. Nat., 106, 645 - 668.

Ferguson, A., 1980. Biochemical Systematics. Blackie, Glasgow, London.

Fitch, W. M. u. Margoliash, E., 1967. Construction of Phylogenetic Trees. Science, 155, 279 - 284.

Gelei, J. von, 1954. Über die Lebensgemeinschaft einiger temporärer Tümpel. III. Ciliaten. Acta Biol. Ac. Sc. Hung., 5, 259 - 343.

Goodmann, M., Braunitzer, G., Stangl, A. u. Schrank, B., 1983. Evidence on human origins from haemoglobins of African apes. Nature, 303, 546 - 548.

Gorman, G. C. u. Renzi Jr., J., 1979. Genetic Distance and Heterozygosity Estimates in Electrophoretic Studies: Effects of Sample Size. Copeia, 2, 242 - 249.

Grell, K. G., 1951. Die Paarungsreaktion von Stylonychia mytilus. Z. Naturf., Teil 6 b, 45 - 47.

Harris, H. u. Hopkinson, D. A., 1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North Holland, Amsterdam, New York.

Hayat, M. A., 1981. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. Arnold, London.

Heckmann, K., 1963. Paarungstypen und genabhängige Paarungstypendifferenzierung bei dem hypotrichen Ciliaten Euplotes vannus O. F. Müller. Arch. Protistenk. 106, 393 - 421.

Heckmann, K. 1964. Experimentelle Untersuchungen an Euplotes crassus. I. Paarungssystem. Konjugation und Determination der Paarungstypen. Z. Vererbungsl., 95, 114 - 124.

Heckmann, K., 1983. Endosymbionts of Euplotes. Int. Rev. Cytol. Suppl. 14, 111 - 143.

Heckmann, K., ten Hagen, R. u. Görtz, H.-D., 1983. J. Protozool., im Druck.

Hemberger, H., 1982. Revision der Ordnung Hypotrichida Stein (Ciliophora, Protozoa) anhand von Protargolpräparaten und Morphogenesedarstellungen. Universität Bonn.

Hennig, W., 1966. Phylogenetic Systematics. Univ. of Illionios Press, Urbana.

Hennig, W., 1982. Phylogenetische Systematik. Pareys Studientexte 34, Parey, Berlin, Hamburg.

Hickey, D. A., 1979. Selection on Amylase Allozymes in Drosophila melanogaster: Selection Experiments Using Several Independently Derived Pairs of Chromosomes. Evolution, 33, 1128 - 37.

Hunter, R. L. u. Markert, C. L., 1957. Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels. Science, 125, 1294 - 1295.

Jones, J. S., 1980. How much genetic variation? Nature, 288, 10 - 11.

Kahl, A., 1932. Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria), 3. Spirotricha. Die Tierwelt Deutschlands, Teil 25, Verlag von G. Fischer, Jena, 399 - 650.

Kimball, R. F., 1942. The Nature and Inheritance of mating Types in Euplotes patella. Genetics, 27, 269 - 285.

Kimura, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular Level. Nature 217, 624 - 626.

King, M.-C., u. Wilson A. C., 1975. Evolution at two Levels in Humans and Chimpanzees. Science, 188, 107 - 116.

Klobutcher, L. A., Swanton, M. T., Donini, P. u. Prescott, D. M., 1981. All Gene - Sized Molecules in Four Species of Hypotrichs have the same Terminal Sequence and an unusual 3´Terminus. Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 3015 - 3919.

Kojima, K., Gillespie, J. u. Tobari, J., 1970. A profile of Drosophila Species´Enzymes Assayed by Electrophoresis. I. Number of Allels, Heterozygosities and Linkage Disequilibrium in Glucose - Metabolizing Systems and Some Other Enzymes. Biochem. Genet., 4, 627 - 637.

Levin, D. A. u. Crepet, W. L., 1973. Genetic Variation in Lycopodium lucidulum: A Phylogenetic Relic´. Evolution 27, 622 - 632.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. u. Randall, R. J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reaction. J. Biol. Chem., 193, 265 - 275.

Manwell, C. u. Baker, C. M. A., 1963. A sibling Species of Sea Cucumber Discovered by Starch Gel Electrophoresis. Comp. Biochem. Physiol., 10, 39 - 53.

Müller, O. F., 1773. Vermium Terrestrum et Fluviatilum, seu Animalium Infusorium, Helminthicorum et Testaceorum, non Marinorum. Succincta Historia, Havniae et Lipsiae.

Nanney, D. L. u. McCoy, J. W., 1976. Characterization of the Species of the Tetrahymena pyriformis Complex. Tr. Am. Microsc. Soc., 95, 664 - 682.

Nanney, D. L., 1980. Experimental Ciliatology. An Introduction to Genetic and Developmental Analysis in Ciliates. J. Wiley a. Sons, New York.

Nei, M., 1972. Genetic Distance Between Populations. Am. Nat., 106, 283 - 292.

Nei, M., 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. Genetics, 89, 583 - 590.

Patton, J. C. Baker, R. J. u. Avise, J. C., 1981. Phenetic and Cladistic Analysis of Biochemical Evolution in Peromyscine Rodents. Mamalian Population Genetics. Smith, M. H. u. Joule, J., Ed. University of Georgia Press, Athens, 288 - 308.

Pinsker, W. u. Buruga, J., 1982. Comparative study of allozyme variation in six species of the Drosophila obscura - group. Z. Zool. Syst. Evolut. - forsch., 20, 53 - 63.

Pringle, C. R., 1956. Antigenic variation in Paramecium aurelia, variety 9. Z. Abst. Vererbsl., 87, 421.

Reimer, L. u. Pfefferkorn, G., 1977. Rasterelektronenmikroskopie. 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin.

Rider, C. C. u. Taylor, C. B., 1980. Isoenzymes. London, New York.

Rosenbauer, K. A. u. Kegel, B. H., 1978. Rasterelektronenmikroskopische Technik. Stuttgart.

Sarich, V. M., 1977. Rates, sample sizes and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. Nature, 265, 24 - 28.

Schlee, D., 1971. Die Rekonstruktion der Phylogenese mit Hennigs Prinzip. Aufsätze u. Red. Senckenberg. naturforsch. Ges., 20, 1 - 62.

Selander, R. K., Yang, S. Y., Lewontin, R. C. u. Johnson, W. E., 1970. Genetic Variation in the Horseshoe crab (Limulus polyphemus), a phylogenetic "relic". Evolution, 24, 402 - 414.

Shaw, C. R. u. Koehn, A. L., 1968. Starch Gel Zone Electrophoresis of Enzymes. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Smith, I., Ed. William Heinemann Medical Books, Bath, 325 - 364.

Shaw, C. R. u. Prasad, R., 1970. Starch Gel Electrophoresis of Enzymes - A Compilation of Recipes. Biochem. Genet., 4, 297 - 320.

Shigenaka, Y., Watanabe, K. u. Kaneda, M., 1973. Effects of Glutaraldehyd and Osmium Tetraoxide on Hypotrichous Ciliates and Determination of the most Satisfactory Fixation Methods for Electron Microscopy. J. Protozool., 20, 414 - 420.

Sleigh, M., 1981. The Biology of Protozoa. Contemporary Biology. Arnold, London.

Sneath, P. H. A. u. Sokal, R. R., 1973. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman u. Co., San Franzisco.

Sonneborn, T. M., 1937. Sex, sex inheritance and sex determination in Paramecium aurelia. Proc. Nat. Acad. Sci., 23, 378 - 385.

Sonneborn, T. M., 1957. Breeding systems, reproductive methods and species problems in protozoa. The Species Problem. Mayr, E., Ed. Publ. No. 50, AAAS, Washington D. C., 155 - 324.

Sonneborn, T. M., 1975. The paramecium aurelia complex of fourteen sibling species. Trans. Am. Micros. Soc., 94, 155 - 178.

Stein, F., 1859. Der Organismus der Infusionsthiere nach eigenen Forschungen in systematischer Reihenfolge bearbeitet. Leipzig.

Steinbrück, G. u. Schlegel, M., 1983. Characterization of two Sibling Species of the Genus Stylonychia (Ciliata, Hypotricha): S. mytilus and S. lemnae n. Sp. II. Biochemical chracterization. J. Protozool., im Druck.

Stiller, J., 1974. Jarolabascskas csillosok - Hypotricha. Fauna Hung., 115, 153.

Stratil, A., 1967. The Effect of Iron Addition to Avian Egg White on the Behaviour of Conalbumin Fractions in Starch Gel Electrophoresis. Comp. Biochem. Physiol., 22, 227 - 233.

Tait, A., 1970. Enzyme Variation Between Syngens in Paramecium aurelia. Biochem. Genet., 4, 461 - 470.

Tait, A., 1978. Species Identification in Protozoa: Glucosephosphate Isomerase variation in the Paramecium aurelia group. Biochem. Genet., 16, 945 - 955.

Wilson, A. C., 1976. Gene Regulation in Evolution. Molecular Evolution. Ayala, F. J., Ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA.

Akademische Lehrer

D. Ammermann
K. D. Balke
H. K. Barth
F. W. Bentrup
W. U. Berthold
H. Blume
A. Borsdorf
D. Bunke
K. Drumm
H. Erkert
H. D. Frey
W. Frey
K. G. Grell
H. D. Haas
K. P. Hadeler
A. Hager
Ch. Hannß
W. Harder
D. Herm
A. Karger
P. Lange
W. E. Mayer
G. Mickoleit
F. P. Möhres
J. Neugebauer
F. Oberwinkler
R. Prinzinger
W. Rähle
B. Röttger
K. H. Schröder
B. Schwemmle
H. U. Seitz
U. Seitz
W. Seyffert
D. Sperlich
H. Stransky
H. Weigold
F. Westphal
H. Wilhelmy

Lebenslauf

31. August 1952	geboren in Reutlingen Vater: Heinz Schlegel Mutter: Margot Schlegel, geb. Kuttler
1959 - 1963	Grundschule in Reutlingen
1963 - 1971	Friedrich - List - Gymnasium Reutlingen
Juni 1971	Abitur
April 1972 - August 1973	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Reutlingen
SS 1974 - SS 1980	Studium der Biologie und Geographie an der Universität Tübingen
Oktober 1978	Staatsexamen Geographie
Oktober 1979	Staatsexamen Biologie
November 1979 - Mai 1980	Staatsexamensarbeit bei Herrn Prof. Dr. D. Ammermann am Institut für Biologie III, Abt. Zellbiologie, der Universität Tübingen; Thema: "Untersuchungen zur Systematik hypotricher Ciliaten der Gattung Stylonychia Ehrenberg 1838".
Oktober 1980 - September 1983	Doktorand bei Herrn Prof. Dr. Ammermann
seit Dezember 1979	verheiratet mit der Krankenschwester Renate Schlegel, geb. Kuppler
seit Oktober 1980	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biologie III der Universität Tübingen